

Charakterisierung des Ratten-Cytomegalovirus- Isolats „England“

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Jakob Ettinger

aus München

2011

Die Untersuchungen zur vorliegenden Dissertation wurden von Mai 2006 bis Dezember 2009 am Robert-Koch-Institut zu Berlin unter Leitung von PD Dr. Annette Mankertz durchgeführt.

1. Gutachter: PD Dr. Annette Mankertz

2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Disputation am 18.11.2011

Pour mes chers grands-parents

Für meine lieben Großeltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Herpesviren	1
1.1.1	Cytomegaloviren.....	2
1.1.2	Das Ratten-Cytomegalovirus (RCMV)	5
1.2	Immunantwort gegen CMV	6
1.2.1	Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)	7
1.2.2	Modulation der Immunantwort.....	9
1.2.3	RCTL als möglicher NK-Zellinhibitor	10
1.3	BAC-Technologie und homologe Rekombination bei Herpesviren	10
2	Zielsetzung der Arbeit	12
3	Material und Methoden.....	13
3.1	Material.....	13
3.1.1	Bakterienstämme.....	13
3.1.2	Bakterielle Nährmedien	13
3.1.3	Eukaryotische Zellen	13
3.1.4	Plasmide	13
3.1.5	RCMV-E Varianten und BACs.....	14
3.1.6	Antibiotika	14
3.1.7	Antikörper.....	14
3.1.8	Kommerzielle Kits	14
3.1.9	Enzyme	14
3.1.10	DNS-Standards.....	15
3.1.11	Chemikalien	15
3.1.12	Oligonukleotide (Primer) und Sonden	15
3.1.13	Selbst hergestellte Puffer und Lösungen	16
3.1.14	Verbrauchsmaterial.....	17
3.1.15	Geräte	18
3.1.16	Tiere	18
3.1.17	Programme	18
3.2	Molekularbiologische Methoden	19
3.2.1	Kultivierung von Bakterien.....	19

3.2.2	Herstellung elektrokompetenter Bakterien	19
3.2.3	Transformation von Bakterien durch Elektroporation	19
3.2.4	RecA-vermittelte homologe Rekombination in <i>E. coli</i>	20
3.2.5	Präparation von Plasmid-DNS aus <i>E.coli</i> mittels alkalischer Lyse.....	21
3.2.6	Präparation von Plasmid-DNS aus <i>E.coli</i> mittels kommerzieller Kits	22
3.2.7	Bestimmung der DNS-Konzentration mittels Nanodrop	23
3.2.8	Isolierung von DNS aus tierischem Gewebe	23
3.2.9	Isolierung von RNS aus Zellkultur und tierischem Gewebe	23
3.2.10	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	24
3.2.11	Quickchange-PCR zum Einfügen von Punktmutationen	25
3.2.12	Herstellung von cDNS durch reverse Transkription.....	25
3.2.13	Sequenzierungs-PCR.....	26
3.2.14	Bestimmung der Genomtermini.....	26
3.2.15	Quantitative real-time PCR (qPCR)	27
3.2.16	Erstellung der Standardgeraden für qPCRs	28
3.2.17	Quantifizierung von Versuchsproben mittels qPCR.....	29
3.2.18	Restriktionsverdau von Plasmid-DNS	29
3.2.19	Dephosphorylierung von Plasmid-DNS und Ligation.....	29
3.2.20	TOPO TA-Klonierung	30
3.2.21	Agarose-Gelelektrophorese	30
3.2.22	Aufreinigung von DNS-Fragmenten	30
3.3	Zellbiologische Arbeitsmethoden	31
3.3.1	Zellkultivierung.....	31
3.3.2	Archivierung von Zellen	31
3.3.3	CaHPO ₄ -Transfektion	31
3.3.4	Transfektion mittels PolyFect	32
3.3.5	Anzucht von Viren.....	32
3.3.6	Rekonstitution von Viren aus BACs	33
3.3.7	Titration von Virusstocks	33
3.3.8	Entfernung der BAC-Kassette mittels Cre-Recombinase.....	34
3.3.9	Untersuchung der Replikationsfähigkeit von Viren durch Wachstumskurven.....	34
3.3.10	Isolierung von Virion-DNS	35
3.4	Tierexperimentelle Methoden	36
3.4.1	Gruppeneinteilung der Versuchstiere.....	36

3.4.2	Antikörperapplikation und Infektion der Tiere	37
3.4.3	Tötung und Organentnahme	37
3.4.4	Herstellung von Organhomogenisaten und Titration der Organe.....	37
3.5	Computergestützte Methoden zur Sequenzanalyse.....	37
3.5.1	Identifizierung und Nomenklatur der offenen Leserahmen (ORF) im RCMV-England Genom.....	38
3.5.2	Phylogenetische Analysen	39
4	Ergebnisse	41
4.1	Untersuchung zur Genomstruktur des RCMV-England.....	41
4.1.1	Datenbankgestützte Identifizierung der offenen Leserahmen im RCMV-E Genom	43
4.1.2	Vergleich der RCMV-E ORFs mit den Homologen aus MCMV und RCMV-M	50
4.1.3	Phylogenetische Eingruppierung von RCMV-E	59
4.2	Molekulare und funktionelle Charakterisierung des RCMV C-Typ-Lektin ähnlichen Proteins (RCTL).....	63
4.2.1	Struktur von RCTL und dessen Homologen	63
4.2.2	Regulation von RCTL und rClr-b in RCMV-E infizierten REFs.....	64
4.2.3	Klassifizierung von RCTL als Delayed Early-Gen	66
4.2.4	Bedeutung von RCTL für die <i>in vivo</i> Infektion.....	67
4.3	Reparatur des defekten RCMV-E Δ BAC	71
4.3.1	Reinsertion des deletierten Genomabschnitts und Plaquemorphologie	72
4.3.2	Wachstumskinetik des RCMV-E BAC.....	73
5	Diskussion.....	76
5.1	RCMV-E repräsentiert eine eigene Virusspezies innerhalb der <i>β-Herpesvirinae</i>	76
5.1.1	Vergleich des RCMV-E Genoms mit MCMV und RCMV-M	76
5.1.2	Verwandtschaft von RCMV-E zu anderen Cytomegaloviren.....	80
5.2	RCTL als Inhibitor NK-Zell-vermittelter Lyse	83
5.2.1	Ursprung und Aufbau von RCTL.....	84
5.2.2	Reziproke Regulation von rClrb und RCTL bei einer Infektion.....	85
5.2.3	Anpassung des Immunsystems des Wirts an RCTL	87
5.2.4	RCTL-vermittelte NK-Zell-Inhibition bei Cytomegaloviren	87
5.3	Reparatur und Charakterisierung des RCMV-E BAC	88
6	Zusammenfassung	92

7 Summary	93
8 Literaturverzeichnis.....	94
9 Abkürzungsverzeichnis	105
10 Abbildungsverzeichnis	109
11 Tabellenverzeichnis.....	110
12 Publikationen	112
13 Danksagung	113
14 Eidesstattliche Erklärung.....	114

1 Einleitung

1.1 Herpesviren

Die Bezeichnung *Herpesviridae* basiert auf dem typischen Aufbau der Virionen. Das etwa 125 nm große icosaedrische Kapsid beinhaltet ein 125 kBp (Varicella-Zoster-Virus) bis 230 kBp (Cytomegalovirus) umfassendes doppelsträngiges, lineares DNS-Genom. Das Lumen zwischen Kapsid und der bis zu 200 nm großen Lipidhülle wird von dem sogenannten Tegument ausgekleidet, welches neben zahlreichen viralen Proteinen und RNSs auch zelluläre Bestandteile enthält. Abbildung 1 zeigt den schematisch vereinfachten Aufbau eines Viruspartikels (A) und eine elektronenmikroskopische Aufnahme des Herpes-Simplex-Virus 1 (B).

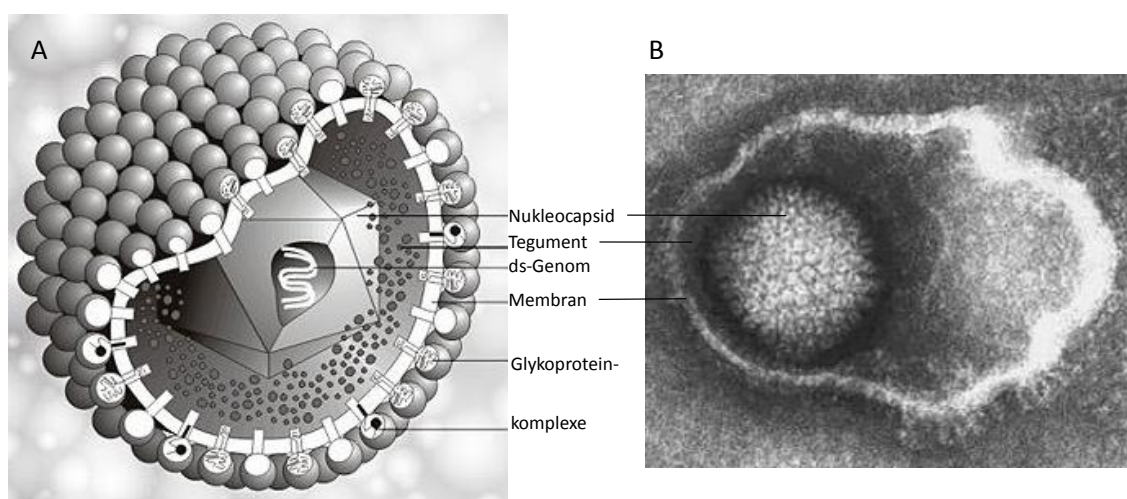


Abbildung 1: Aufbau eines Herpesvirions

Schematischer Aufbau eines Herpes-Virions (www.biografix.de) und elektronenmikroskopische Aufnahme des Herpes-Simplex-Virus 1 (Stannard, Cape Town University).

Herpesviren gehören mit einem evolutionären Ursprung vor ca. 200 Millionen Jahren (Davison, 2002) zu den ältesten und am weitesten verbreiteten Viren, die bei Säugern, anderen Wirbeltierklassen wie Vögeln, Fischen, Reptilien (McGeoch et al., 2006) und Mollusken vorkommen. Auf Basis von Pathogenität, Zelltropismus und Replikationsverhalten wurden die *Herpesviridae* in die drei Unterfamilien α -, β - und γ -*Herpesvirinae* eingeteilt (siehe Tabelle 1).

Vertreter der α -*Herpesvirinae* (z. B. HSV-1) zeichnen sich durch ein breites Zielzellenspektrum und einen kurzen Replikationszyklus aus. Nach der Primärinfektion persistieren diese Viren in den Ganglien peripherer Nerven. Vertreter der β -*Herpesvirinae* wie das Cytomegalovirus (CMV) infizieren ein eingeschränktes Spektrum und vermehren sich *in vitro* deutlich langsamer.

Mitglieder der γ -*Herpesvirinae* (z. B. EBV) besitzen ein sehr enges Wirtszell-spektrum und haben den längsten Replikationszyklus der drei Unterfamilien.

Tabelle 1: Übersicht humanpathogener Vertreter der Herpesviridae modifiziert nach Modrow et al. (Modrow et al., 2010)

Unterfamilie	Humanpathogenes Virus	Mögliche Erkrankung
α -Herpesvirinae	Herpes-Simplex-Virus (HHV-1, HSV-1)	Herpes labialis
	Herpes-Simplex-Virus (HHV-2, HSV-2)	Herpes genitalis
	Varicella-Zoster-Virus (HHV-3, VZV)	Varizellen, Herpes zoster
β -Herpesvirinae	Cytomegalovirus (HHV-5, HCMV)	CMV-Mononucleose, bei Immunsuppression gehäuft auch Hepatitis, Retinitis, Enzephalitis
	HHV-6; HHV-7	Roseola infantum, „Drei-Tage-Fieber“
γ -Herpesvirinae	Epstein-Barr-Virus (HHV-4, EBV)	EBV-Mononukleose, Nasopharynxkarzinom, Lymphome
	Kaposi Sarkom-assoziiertes Herpesvirus (HHV-8, KSHV)	Kaposi Sarkom, Castleman disease

Die in den letzten Jahren zunehmend durchgeführten Genomanalysen führten zu einer neuen Einteilung der Herpesviren. So wurden neben den *Herpesviridae*, die nun nur noch die Viren der Säuger, Vögel und Reptilien beinhalten, die beiden neuen Familien *Alloherpesviridae* und *Malacoherpesviridae* eingeführt. Die *Alloherpesviridae* vereinigen die Viren der Fische und Frösche, während die Viren der Bivalvia den *Malacoherpesviridae* zugeteilt wurden. Gemeinsam bilden die drei Familien die neue Ordnung *Herpesvirales* (Davison et al., 2009).

1.1.1 Cytomegaloviren

Die Cytomegaloviren verfügen über einen sehr langsamen Replikationszyklus, der sich in seiner Dauer von Wirtsspezies zu Wirtsspezies unterscheidet. Der strukturelle Aufbau des CMV-Genoms unterscheidet sich nicht von dem anderer Herpesviren. Mit bis zu 235 kBp verfügen sie über die größte Kodierungskapazität aller Herpesviren. Selbst konservative Analyseverfahren sagen mehr als 200 offene Leserahmen voraus (Pellett & Roizman, 2006).

Cytomegaloviren zeichnen sich durch eine ausgeprägte Speziespezifität aus. Wenngleich einige Viren *in vitro* noch in der Lage sind, Zellen einer fremden Spezies zu infizieren, ist eine Infektion über Speziesgrenzen hinweg nicht möglich. Eine wesentliche Rolle spielen dabei die immunevasiven Gene der Viren. Diese

sind speziell auf die eigene Spezies angepasst und können im Fehlwirt ihre Funktion nicht entfalten, sodass das Virus effizient eliminiert wird.

Pathogenese des humanen Cytomegalovirus (HCMV)

Das humane Cytomegalovirus ist ein weltweit vorkommender Erreger mit einer Durchseuchungsrate von ca. 50 - 60 % in Industrienationen und über 95 % in Afrika (Söderberg-Nauclér, 2006). In immunkompetenten Wirten verläuft die Primärinfektion meist klinisch unauffällig oder mit unspezifischen Symptomen. Nach etwa zwei Wochen geht die Infektion in das Stadium der Persistenz über. Diese ist sowohl durch eine stark reduzierte Virusproduktion in der Speicheldrüse und den Nieren als auch durch die Expression der viralen Latenz-Gene gekennzeichnet (Britt, 2008).

Bei immunsupprimierten Patienten kommt es gehäuft zu schwerwiegenden Krankheitsverläufen (Landolfo et al., 2003). Die drei Hauptrisikogruppen bilden Kinder in utero, AIDS-Patienten und Transplantatempfänger. Daten aus den USA und Entwicklungsländern zeigen, dass in den Industrienationen 0,1 - 1,0 % bzw. 0,5 bis 2 % aller Neugeborenen intrauterin mit HCMV infiziert werden. Durch den Befall des zentralen Nervensystems sind die am häufigsten auftretenden Spätfolgen Störungen der audiovisuellen Wahrnehmung und geistige Retardierung (W. Britt, 2008). In etwa 10 % der Fälle verläuft die symptomatische Primärinfektion der Neugeborenen tödlich (Gandhi & Khanna, 2004; Landolfo et al., 2003).

Da Empfänger von Organtransplantationen zur Vermeidung einer Abstoßungsreaktion immunsuppressiv behandelt werden müssen, kann es zu einer HCMV-Reaktivierung kommen. Etwa drei Viertel aller Transplantierten leiden in der frühen oder späten Phase an den Folgen HCMV-bedingter Komplikationen (Fisher, 2009). Neue Behandlungsmethoden, basierend auf einem besseren Verständnis der HCMV-Immunsystem-Interaktion können dazu beitragen, die Prognose der Patienten zu verbessern.

Replikation

Die Replikation der Cytomegaloviren ist kaskadenartig aufgebaut. Transkription und Translation folgen einem streng vorgegebenen Muster. Entsprechend ihrer Expressionskinetik lassen sich die viralen Gene in die drei Gruppen *immediate early* (IE), *early* oder *delayed early* (E) und *late* (L) einteilen (Fortunato & Spector,

1999; Pellett & Roizman, 2006). Die IE-Genprodukte sind für die Expression der E-Gene nötig, die wiederum die Expression der L-Gene initiieren.

Die in die Virushülle eingelagerten Glykoproteine gB, gH und gL sind für die Bindung an Heparansulfat-Proteoglykan an der Zelloberfläche verantwortlich und vermitteln die Aufnahme des Viruskapsids in die Zelle (Compton, 2004; Ryckman et al., 2006). Die freien Kapside werden zum Nukleus transportiert und die lineare, virale DNS durch die Kernporen in den Kern geschleust, in welchem nach Zirkularisierung des Virusgenoms die Transkription stattfindet (Pellett & Roizman, 2006). Diese unmittelbare Nähe zum Wirtsgenom ermöglicht es den Viren, zelluläre DNS in ihr eigenes Genom zu integrieren und die darauf kodierten Proteine für die eigene Vermehrung zu nutzen. Die zu Beginn der Infektion exprimierten IE-Gene beinhalten verschiedene Transaktivatoren für zelluläre und virale Gene und führen zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase (Bresnahan et al., 2000; Modrow et al., 2010). Darüber hinaus finden sich unter den IE-Genprodukten immunevasive Proteine, die Apoptose, Antigenpräsentation oder die Interferon-medierte Immunantwort stören. Im Verlauf der E-Phase werden die für die virale DNS-Synthese benötigten Gene exprimiert. Neben weiteren immunmodulatorischen Genprodukten werden auch die Proteine der Kapsidreifung produziert. Die L-Phase ist durch die im Zellkern nach dem *rolling circle*-Prinzip stattfindenden DNS-Replikation (Anders et al., 1992) gekennzeichnet. Zeitgleich werden die für die Reifung der Viruspartikel benötigten L-Gene translatiert.

Noch im Kern wird das ds-DNS-Genom in das Kapsid verpackt und anschließend ausgeschleust. Auf dem durch Mikrotubuli vermittelten Transport zur Plasmamembran aggregieren die meisten Tegumentproteine mit dem Kapsid (Sanchez et al., 2000). Die endgültige Membran erhalten die Viren bei der Ausschleusung der Viren aus der Zellmembran, dem sogenannten *budding*.

Tiermodelle mit Cytomegaloviren

Um nach der Primärinfektion erfolgreich im Wirt zu persistieren, exprimieren die Viren viele Gene die dessen Immunsystem regulieren und inhibieren. Dieses Eingreifen in die komplexen Vorgänge der Immunabwehr bedarf einer spezifischen Anpassung an den Wirt und führte zu einer Koevolution von Virus und Wirt (siehe auch 1.2.1), worin auch die strikte Speziesspezifität der Viren begründet ist. Obgleich einige Viren *in vitro* noch in der Lage sind, Zellen fremder

Spezies zu infizieren, ist die Untersuchung des vollständigen Infektionszyklus auf den speziellen Wirt des jeweiligen Virus beschränkt. Da keine Möglichkeit existiert, Versuchstiere mit HCMV zu infizieren, wurden im Laufe der Jahre verschiedene Modellsysteme zur Erforschung der HCMV-Infektion etabliert. Die gebräuchlichsten sind das murine Cytomegalovirus (MCMV) zur Erforschung von Latenz und Reaktivierung (Reddehase et al., 2002, 2006), das Maastricht-Isolat des Ratten-Cytomegalovirus (RCMV-M) zur Untersuchung vaskulärer Erkrankungen und CMV-bedingter Komplikationen bei Organtransplantationen (Streblow et al., 2007, 2008), sowie das CMV des Meerschweinchens (GPCMV) als Modellvirus für die kongenitale CMV-Infektion (Lacayo & Schleiss, 2006). Aufgrund seiner nahen Verwandtschaft zu HCMV wird auch das Virus der Rhesusmakaken (RhCMV) zur Untersuchung herangezogen. In allen erwähnten Modellen werden virale Strategien zur Immunevasion untersucht.

1.1.2 Das Ratten-Cytomegalovirus (RCMV)

Das bisher am besten charakterisierte RCMV ist das 1982 in Maastricht aus *Rattus norvegicus* isolierte RCMV-M (Meijer et al., 1984, 1986; Vink et al., 2000). Sequenzvergleiche von RCMV-M mit MCMV und HCMV zeigten erhebliche Sequenzidentitäten, sowohl auf Nukleotid- als auch auf Proteinebene (Beisser et al., 1998). Das in dieser Arbeit verwendete Virus wurde 1982 ebenfalls aus *Rattus norvegicus* isoliert, initial charakterisiert und als England-Isolat (RCMV-E) bezeichnet (Burns et al., 1988; Priscott & Tyrrell, 1982). Im Vergleich zu RCMV-M fielen dabei die geringere Genomgröße von 203 kBp und das deutlich veränderte Restriktionsmuster auf (Burns et al., 1988). Letzteres deutete bereits darauf hin, dass das England-Isolat nicht durch Deletion einzelner Genomabschnitte aus RCMV-M hervorgegangen ist. Zum damaligen Zeitpunkt waren die verfügbaren Sequenzinformationen des RCMV-E noch auf den *major immediate early* (MIE)-Lokus beschränkt (Sandford & Burns, 1996; Sandford et al., 1993), sodass für einen Vergleich der beiden RCMV untereinander nur ein vergleichsweise kleiner Teil des Genoms herangezogen werden konnte. Bereits in diesen Bereichen zeigten sich nur geringe Übereinstimmungen von 23 % bis 32 %, was Beisser et al. dazu veranlasste, die beiden RCMV-Isolate als zwei unterschiedliche β -Herpesvirusspezies zu betrachten (Beisser et al., 1998). In den darauffolgenden Jahren wurden in RCMV-E verschiedene Gene identifiziert, welche in dieser Art für Cytomegaloviren noch nicht bekannt waren, wodurch die These, es handele

sich bei den beiden RCMV um zwei distinkte Viren, untermauert wurde. Bei diesen Genen handelt es sich um ein CD200-Homolog (e127) (Voigt et al., 2005), ein C-Typ-Lektin-ähnliches Gen (*rct1*) (Voigt et al., 2001, 2007) ein virales C-Chemokin (ORF8) und ein zweites C-Typ-Lektin-ähnliches Gen (*rct2*) (Voigt, nicht publiziert).

1.2 Immunantwort gegen CMV

Bei der Kontrolle der CMV-Primärinfektion spielen sowohl die Interferon-Antwort als auch die NK-Zell-Aktivität, die beide der angeborenen Immunantwort zuzurechnen sind, eine entscheidende Rolle (Noda et al., 2006). Die angeborene Immunantwort ist erregerspezifisch, und die daran beteiligten Zellen unterlaufen im Gegensatz zu den T- und B-Zellen keine somatische Rekombination. Pathogene werden über sogenannte *pathogen associated molecular patterns* (PAMP) erkannt. PAMP sind unter Pathogenen konservierte Strukturen, wie dsRNS oder das bakterielle Lipopolysaccharid (LPS), welche im Wirtsorganismus nicht vorkommen. Toll-like Rezeptoren (TLR) der Wirtszelle spielen hierbei eine besondere Rolle, da sie an diese PAMP binden können und dadurch über Signalkaskaden Immunreaktionen in Gang gesetzt werden (Akira & Takeda, 2004; Akira, et al., 2006; Lotze et al., 2007). Durch die Bindung an die TLRs kommt es zur Expression der Interferon-stimulierten Gene (ISG) (Compton & Boehme, 2006). Infolgedessen werden Zellen in einen antiviralen Status versetzt, der die Virusreplikation entscheidend stört (Stark et al., 1998). Verschiedene Arbeiten zeigten, dass mindestens die TLR2, 3 und 9 durch CMV aktiviert werden (Compton et al., 2003; Tabeta et al., 2004). TLR3 bindet virale ds-RNS, die durch die bidirektionale Transkription der viralen Gene entsteht. TLR9 hingegen erkennt CpG-reiche Domänen des viralen Genoms (Iversen et al., 2009; Tabeta et al., 2004). Über verschiedene Signalkaskaden kommt es zur Aktivierung der *interferon regulatory factors*. Diese führen zur Sekretion weiterer proinflammatorischer Cytokine, die wiederum Makrophagen, dendritische Zellen und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) an den Ort der Infektion rekrutieren.

Makrophagen und dendritische Zellen verfügen beide über PAMP-Rezeptoren und sind in der Lage, Pathogene zu phagozytieren und die verdauten Proteine über die sogenannten *Major Histocompatibility Complexes* (MHC) den T-Zellen zu präsentieren. Es werden zwei Klassen von MHCs unterschieden. MHC-Klasse I wird ubiquitär auf allen Zellen exprimiert und im endoplasmatischen Retikulum mit

neu synthetisierten Peptiden beladen. MHC-Klasse II-Moleküle befinden sich primär auf Makrophagen und dendritischen Zellen. Die über MHC-Klasse II präsentierten Antigene stammen aus phagozytierten und in Phagosomen abgebauten viralen Proteinen (Vyas et al. 2008). Eine effiziente Antigenpräsentation durch MHC ist die Voraussetzung für den Aufbau einer raschen und spezifischen Immunantwort, weshalb es nicht verwunderlich ist, dass Viren speziessübergreifend zahlreiche Mechanismen entwickelt haben, diesen Schritt zu manipulieren (siehe 1.2.2).

Durch die Antigenpräsentation und die Ausschüttung weiterer Cytokine wird die Reifung einer spezifischen T-Zell-Antwort induziert. Bis auf wenige Ausnahmen ist der Langzeitschutz nicht Antikörper-, sondern T-Zell-vermittelt (Pellett & Roizman, 2006).

1.2.1 Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)

NK-Zellen erkennen über verschiedene Rezeptoren körpereigene Zellen, die sich aufgrund tumorbedingter Entartung oder einer Infektion verändert haben, als geschädigt (L. L. Lanier, 2005). Sie werden entweder durch Typ-I-Interferone oder auch durch direkten Zell-Zell-Kontakt aktiviert. Die Regulation erfolgt über ein breites Spektrum zeitgleich exprimierter inhibitorischer und stimulierender NK-Zell-Rezeptoren (NKR) (Brown & Scalzo, 2008). Eine vitale, gesunde Zelle trägt auf ihrer Oberfläche sowohl stimulatorische als auch inhibitorische Liganden für NK-Rezeptoren (Abbildung 2 A). Solange beide Ligandentypen auf der Zelle präsentiert werden, ist die Inhibition dominant und die NK-Zelle wird nicht aktiviert. Man spricht in diesem Fall von einer Selbst- bzw. *self*-Identifikation (Kärre, et al., 1986). Im Rahmen einer Infektion reagieren Zellen mit einer deutlich verringerten Expression inhibitorischer Liganden und verlieren somit ihre *self*-Identifikation (Abbildung 2 B). Eine solche *missing self*-Zelle wird von den NK-Zellen erkannt und vernichtet, was zu einer Hemmung der Virusproliferation führt (Reddehase, 2002).

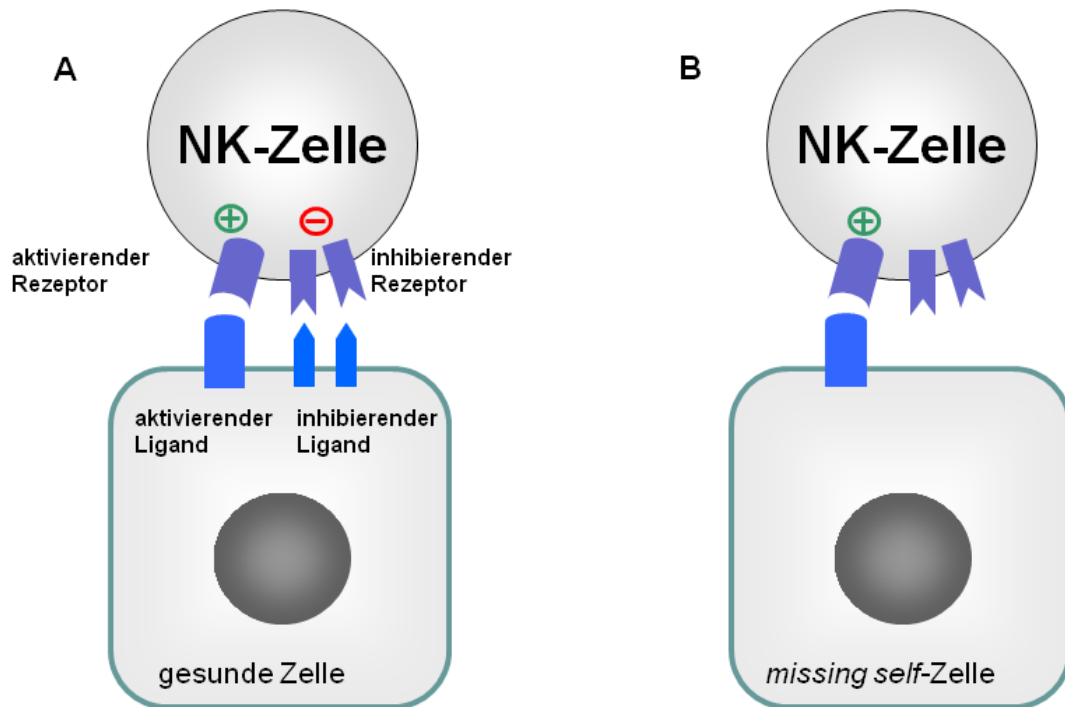


Abbildung 2: Missing-self Aktivierung von NK-Zellen

A Eine gesunde Zelle exprimiert auf ihrer Oberfläche sowohl aktivierende als auch inhibitorische Liganden und ist somit vor der NK-Zell medierten Lyse geschützt. **B** Durch onkogene Entartung oder Infektion verliert die Zelle ihre inhibitorischen Liganden und kann durch die NK-Zellen zerstört werden.

Eine besondere Rolle spielen in diesem Zusammenhang die MHC-Klasse I-Moleküle, welche ebenfalls als inhibitorische Liganden fungieren (Anfossi et al., 2006). Zellen mit reduziertem MHC-I-Gehalt an der Oberfläche werden durch NK-Zellen erkannt und vernichtet. Die Hauptaufgabe der MHC-I Moleküle liegt in der Präsentation von Antigenen und folglich der Stimulation der T-Zell-Antwort. Eine Hemmung der Beladung oder Reduktion dieser Moleküle auf der Oberfläche begünstigt in diesem Falle eine Infektion. Andererseits führt dies zur Eliminierung der infizierten Zelle durch die NK-Zellen. Die Hemmung nur eines dieser Wege durch das Virus würde somit unweigerlich zur Aktivierung des anderen führen und zeigt somit die Komplexität der Anforderung an die virale Immunevasion.

Die drei bekanntesten MHC-I-erkennenden NKR-Familien sind NKR-P1, Ly49 und CD94-NKG2 (Yokoyama & Plougastel, 2003). Für den NK-Rezeptor NKR-P1 sind mit Clr-b und Clr-g zwei Liganden beschrieben, welche keinerlei Ähnlichkeit zu MHC-I aufweisen (Carlyle et al., 2004; Iizuka et al., 2003). Clr-b, der natürliche Ligand des inhibitorischen Rezeptors NKR-P1B, verfügt über ein ubiquitäres Expressionsmuster, wie der MHC-I-Ligand des Ly49-Rezeptors. Murine

Tumorzellen mit deutlich reduzierter Clr-b Expression werden von NK-Zellen erkannt und eliminiert (Mesci et al., 2006).

1.2.2 Modulation der Immunantwort

Wie unter 1.1.1 bereits erwähnt, kodiert das CMV-Genom zahlreiche Proteine, um die Immunantwort zu seinen Gunsten zu modulieren. Viele dieser Manipulatoren greifen sehr spezifisch Mechanismen der Immunreaktion des Wirtes an. Durch heterologe Expression dieser Proteine oder Infektionsversuche mit Deletionsmutanten der entsprechenden Viren lassen sich detaillierte Erkenntnisse über die Funktionsweise und Regulation der Immunevasion gewinnen.

Aus diesem Grund ist die CMV-Infektion eines der bedeutendsten Modelle der Immunevasionsforschung (Reddehase, 2002). Die wichtigsten Bereiche sind hier: 1. Die Inhibition intrinsischer Reaktionen wie Apoptose und der Interferon-vermittelten Abwehr, 2. die Hemmung der angeborenen NK-Zell- und Chemokin-medierten Immunantwort, sowie 3. die Störung der erworbenen T- und B-Zell-Antwort (Pellett & Roizman, 2006). Ein Großteil der immunmodulatorischen Gene hemmen die T- oder NK-Zell-vermittelte Antwort durch negative Regulation ihrer Aktivatoren. Wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, spielen hier MHC-Klasse I-Moleküle eine bedeutende Rolle. Die verschiedenen CMVs verfügen über Proteine um die Antigenpräsentation über MHC-Klasse I-Moleküle zu verhindern. MCMV (z. B. m06, m152, m138, m145 und m155) und HCMV (z. B. US2, US3, US6, US11, UL16 und UL142) kodieren für eine Vielzahl von Genen zur Manipulation zellulärer Gene (Lenac et al., 2006; Lodoen & Lanier, 2006; Wills et al., 2005). Darüber hinaus wurden sowohl in MCMV als auch HCMV virale Proteine gefunden, die die Funktion zellulärer Liganden übernehmen können (Lodoen & Lanier, 2006; Vidal & Lanier, 2006). Besonders hervorzuheben ist hier m157, welches durch direkte Bindung an den inhibitorischen MHC-Klasse I-Rezeptor Ly49I die infizierte Zelle vor der NK-Zell-vermittelten Zerstörung schützt. Das in RCMV-E kodierte RCMV C-Typ-Lektin-ähnliche Protein (RCTL) ist das erste bislang beschriebene virale Protein, welches nicht zur Klasse der MHC-Klasse I-Proteine zu zählen ist und in die *missing self*-Aktivierung der NK-Zellen eingreift (Voigt et al., 2007).

1.2.3 RCTL als möglicher NK-Zellinhibitor

Die Expression und Struktur des RCTL wurden erstmalig 2001 beschrieben (Voigt et al., 2001). Virale Homologe zu C-Typ-Lektin-ähnlichen Proteinen waren zuvor schon bei *Myxomaviren* (Cameron et al., 1999) und den *Poxviridae* (Goebel et al., 1990) bekannt, bei Herpesviren jedoch zuvor nicht beschrieben worden. Der Leserahmen des RCTL umfasst insgesamt 2,4 kBp und verfügt mit 5 Exons und 4 Introns über eine für eukaryotische Gene typische Intron-Exon-Struktur, während die Homologe der *Poxviridae* nicht gespleißt werden (Voigt et al., 2001). Die mRNA des RCTL enthält alle 5 Exons, jedoch werden nur die Exons 2 bis 5 translatiert. Die C-Typ-Lektin-ähnliche Domäne befindet sich innerhalb der Exons 3 bis 5. Zum Zeitpunkt der Erstbeschreibung standen die Sequenzen der NKRP1-Rezeptoren und ihrer Liganden noch nicht für Vergleichsuntersuchungen zur Verfügung. So wurde mittels BLAST-Analysen das zelluläre CD69 als mögliches zelluläres Homolog angenommen. Eine RCTL-Deletionsmutante zeigte *in vitro* keinerlei Wachstumsnachteil gegenüber dem Wildtypvirus (Voigt et al., 2001).

Da Viren einem hohen Selektionsdruck bezüglich ihrer Genomgröße und der Kodierungskapazität unterliegen, werden redundante Bereiche wie Introns aus dem Genom entfernt. Die für eukaryotische Proteine typische Intron-Exon-Struktur spricht deutlich dafür, dass es sich bei RCTL um ein evolutionsgeschichtlich junges Gen handelt.

1.3 BAC-Technologie und homologe Rekombination bei Herpesviren

Für die funktionelle Untersuchung viraler Gene ist die Herstellung von Mutanten unverzichtbar. Die für kleinere Viren gängigen Klonierungsmethoden stoßen schon aufgrund der Genomgröße und dem damit einhergehenden Mangel an nutzbaren Restriktionsenzymen an ihre Grenzen. Durch gezielte homologe Rekombination ist es möglich, einzelne Punktmutationen oder größere Deletionen in das virale Genom einzufügen.

Die Generierung von Virusmutanten durch Rekombination in eukaryotischen Zellen ist sehr zeitintensiv und schwer zu kontrollieren. Dabei wird die virale DNS zusammen mit einem, die gewünschte Mutation tragenden, linearen DNS-Fragment transfiziert. Die zelleigenen Rekombinationsenzyme integrieren dieses lineare Fragment unter Entfernung des korrespondierenden Wildtyp-

Genomabschnitts in das virale Genom. Da die entstehenden Mutanten nicht klonal sind, müssen sie über einen zusätzlich eingebrachten Marker identifiziert und durch zahlreiche Vereinzlungsschritte aus dem Gemisch mit den Wildtyp-Viren (wt) isoliert werden. Für den Fall, dass das mutierte Virus einen Wachstumsnachteil gegenüber den WT-Viren aufweist, ist die Isolierung deutlich erschwert, und die Mutagenese essentieller Bereiche ist ohne die vorherige Herstellung einer komplementierenden Zelllinie unmöglich. Häufig entstehen bei diesem Verfahren ungewünschte Nebenmutationen, die erst am Ende der Mutagenese durch Restriktionsverdau und Sequenzierung identifiziert werden können.

Messerle et al. klonierten erstmals ein Herpesvirus, das murine CMV, als bakterielles artifizielles Chromosom (BAC) (Messerle et al., 1997). Durch den Transfer der viralen DNS in Bakterien konnten viele der oben genannten Nachteile umgangen werden. Für *E.coli* existieren zahlreiche induzierbare und dadurch gut kontrollierbare Rekombinationssysteme wie das RecA- oder das λ -Phagenbasierte Red E/T-System (Adler et al., 2003; Zhang et al., 1998). Die ständige Weiterentwicklung dieser Methoden führte zu einer Reihe optimierter Verfahren, die es ermöglichen, zuverlässig Mutationen oder sich nach Transfektion selbstentfernende BAC-Kassetten in die Herpesvirusgenome einzufügen (Tischer et al., 2010; Wang et al., 2009; Warming et al., 2005). Darüber hinaus handelt es sich bei BACs um sogenannte *low copy*-Plasmide, welche nur in einer oder sehr wenigen Kopienzahlen pro Bakterium vorkommen, sodass man schon sehr früh im Rahmen der Mutagenese klonal arbeiten kann. Die Entkoppelung der Mutagenese vom viralen Replikationszyklus bringt nicht nur einen immensen zeitlichen Vorteil mit sich, sondern es können ebenfalls Mutationen in essentiellen oder das Wachstum beeinträchtigenden Genbereichen vorgenommen werden, ohne auf ein replikationsfähiges Virus angewiesen zu sein. Die einfache, unkomplizierte BAC-Präparation aus Bakterien ermöglicht zudem eine engmaschige Kontrolle zu fast jedem Zeitpunkt der Mutagenese. Durch diese zahlreichen Vorteile haben sich BACs binnen weniger Jahre als wichtiges Werkzeug der Herpesvirusforschung fest etabliert. Infolgedessen nimmt die Zahl neu klonierter Viren als BACs stetig zu. Hierzu zählen u.a. HSV-1 und -2, VZV (Nagaike et al., 2004), EBV (Kanda et al., 2004), KSHV (Zhou et al., 2002), EHV (Rudolph et al., 2002), GPCMV (Cui et al., 2008; McGregor & Schleiss, 2001) und HCMV (Borst et al., 1999).

2 Zielsetzung der Arbeit

Für das Ratten-Cytomegalovirus (RCMV) sind bislang zwei unterschiedliche Isolate aus Maastricht (RCMV-M) und aus England (RCMV-E) bekannt. Bei der Erstbeschreibung des RCMV-E konnte gezeigt werden, dass sich dieses Virus hinsichtlich Genomgröße und Restriktionsmuster deutlich von RCMV-M unterscheidet (Burns et al., 1988). Bislang sind von RCMV-E nur vereinzelte Genomfragmente sequenziert und publiziert worden (Voigt et al., 2001, 2005). Diese kurzen Sequenzabschnitte deuteten bereits darauf hin, dass es sich bei den beiden RCMV-Isolaten nicht um zwei Virusstämme, sondern eher um zwei distinkte Virusspezies handelt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden im RCMV-E Genom potenzielle offene Leserahmen (ORF) identifiziert und mit homologen Genen verwandter CMVs verglichen. Auf diese Weise wurden neben den bekannten, in CMVs konservierten Genen auch neue, bislang unbekannte Gene gefunden, die ausschließlich in RCMV-E kodiert sind. Anhand der neu gewonnenen Sequenzinformation wurden Stammbaumanalysen zur phylogenetischen Eingruppierung von RCMV-E durchgeführt.

Zu Beginn dieser Arbeit war in RCMV-E ein gespleißtes C-Typ-Lektin-ähnliches Gen (*rctl*) bekannt, das eine große Sequenzähnlichkeit zu den Genen der NK-Zell-Rezeptoren aufwies (Voigt et al., 2001). Voigt et al. konnten bereits zeigen, dass eine Mutante, in welcher *rctl* deletiert wurde, zu keinerlei Wachstums-einschränkung in Zellkultur führt (Voigt et al., 2001). Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde RCTL molekular und funktionell charakterisiert und so die Bedeutung des Proteins im Zusammenhang einer Infektion aufgeklärt.

Die Klonierung von Virusgenomen als Bakteriell-artifizielles Chromosom (BAC) hat sich bei Herpesviren als effiziente Methode zur Generierung von Virusmutanten etabliert. Dabei wird eine BAC-Kassette in das virale Genom eingesetzt, die die Vermehrung des viralen Genoms in Bakterien ermöglicht. Durch bakterielle Rekombinationsenzyme können Virusmutanten wesentlich schneller und einfacher generiert werden, als es durch eukaryotische Rekombination möglich ist. In dieser Arbeit wurde ein solcher RCMV-E BAC kloniert und bezüglich seines cytopathischen Effekts (CPE) und seines Wachstumsverhaltens analysiert.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Bakterienstämme

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Bakterien leiten sich vom Laborstamm *E.coli K12* ab.

Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Herkunft/Referenz
DH5 α	lacU169 (Φ 80lacZ Δ M15) hsd R1 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, Göttingen, Deutschland
DH10B	F- <i>mcrA</i> (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) 80 <i>lacZ</i> M15 <i>lacX74</i> <i>recA1 endA1 ara 139</i> (<i>ara, leu</i>)7697 <i>galJ galK -rpsL</i> (<i>StrR</i>) <i>nupG</i> (NCBI-Nummer: NC_010473)	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland

3.1.2 Bakterielle Nährmedien

Die Bakterien wurden als Suspensionskultur in sterilem LB-Medium oder zur Vereinzelnung von Kolonien auf LB-Agar-Platten kultiviert. Die Selektion erfolgte durch Zugabe entsprechender Antibiotika. Für auf Blau/Weiß-Screening basierende Selektion wurden den Platten noch IPTG und X-Gal in einer Endkonzentration von 0,2 mM bzw. 40 μ g/ml zugegeben.

Tabelle 3: Bakterielle Nährmedien

Medium	Zusammensetzung
LB ₀ -Medium	1 % Bacto-Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 1 % NaCl; pH 7,5
LB _{Amp} -Medium	LB ₀ -Medium; Zugabe von Ampicillin auf eine Endkonzentration von 100 μ g/ml
LB _{Amp} -Medium	LB ₀ -Medium; Zugabe von Chloramphenicol auf eine Endkonzentration von 34 μ g/ml
LB _{Amp/Kan} -Medium	LB ₀ -Medium; Zugabe von Kanamycin auf eine Endkonzentration von 50 μ g/ml und Ampicillin auf eine Endkonzentration von 100 μ g/ml
LB _{Kan/Cam} -Medium	LB ₀ -Medium; Zugabe von Kanamycin und Chloramphenicol auf eine Endkonzentration von 50 und 34 μ g/ml
LB _{Amp} -Platten	LB _{Amp} -Medium + 1,5 % Agar
LB _{Amp/Kan} -Platten	LB _{Amp/Kan} -Medium + 1,5 % Agar
LB _{Kan/Cam} -Platten	LB _{Kan/Cam} -Medium + 1,5 % Agar
LB _{Cam/5%Suc} -Platten	LB _{Cam} -Medium + 1,5 % Agar

3.1.3 Eukaryotische Zellen

Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden ausschließlich mit embryonalen Rattenfibroblasten (REF) durchgeführt (Bruggeman et al., 1982).

3.1.4 Plasmide

Tabelle 4: Plasmide

Name	Art	Resistenz gegen	Verwendung	Herkunft/Referenz	Anmerkung
pcDNS3	high copy	Ampicillin	Klonierung	Stratagene, La Jolla, USA	
pBrepCre	low copy	Ampicillin	Anzucht von Viren ohne BAC-Kassette	Brune W.	
pST76KSR	low copy	Kanamycin	Transfer-Vektor zur BAC-Reparatur	Voigt S. (Hobom et al., 2000)	Temperatur-sensitiver Origin 30 °C
pHA2	BAC	Chloramphenicol	Klonierung des RCMV-E als BAC	Zimmermann A.	
pEGFP-N1	high copy	Kanamycin	Transfektionskontrolle	Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich	

3.1.5 RCMV-E Varianten und BACs

Tabelle 5: RCMV-E Varianten und BACs

Virus/BAC	Beschreibung
RCMV-E wt	Nicht modifiziertes, in England aus <i>Rattus norvegicus</i> isoliertes RCMV, welches auf embryonalen Rattenfibroblasten (REF) in Zellkultur gezüchtet wird.
RCMV-E Δ RCTL	Entspricht dem RCMV-E wt, jedoch wurde der ORF für das RCTL durch homologe Rekombination entfernt.
RCMV-E REV	Ein aus RCMV Δ RCTL gewonnenes Virus, bei dem der RCTL-Genomabschnitt wieder eingefügt wurde, sodass es wieder dem RCMV-E wt entspricht.
RCMV-E Δ BAC	Rekombinantes RCMV-E, welches als BAC kloniert wurde und das grün fluoreszierende Protein egfp exprimiert. Dieses Virus verfügt über eine ca. 8 kbp Deletion im Hind M Bereich.
RCMV-E BAC	Entspricht dem RCMV-E Δ BAC, wobei die Deletion wieder eingesetzt wurde.
RCMV-E CRE	Ein aus dem RCMV-E BAC hervorgegangenes Virus, aus welchem mittels CRE-LOX Rekombination die BAC-Kassette bis auf eine LoxP-site entfernt wurde

3.1.6 Antibiotika

Tabelle 6: Antibiotika zu Selektion von Bakterien und als Zellkultursupplement

Antibiotika	Arbeitskonzentration	Selektionsorganismus
Ampicillin	100 μ g/ml	E.coli-Stämme
Chloramphenicol	15 μ g/ml	E.coli-Stämme
Kanamcin	50 μ g/ml	E.coli-Stämme
Penicillin	100 U/ml	Zellkulturmediumsupplement
Streptomycin	100 μ g/ml	Zellkulturmediumsupplement

3.1.7 Antikörper

Die Antikörper 3.2.3 und Asialo GM1 wurden in den Tierversuchen zur NK-Zell-Depletion der Versuchstiere verwendet.

Tabelle 7: Antikörper zu NK-Zell-Depletion

Antikörper	Verwendung	Herkunft
3.2.3 (Maus)	Depletion der NK-Zellen im Tierversuch	ENDOGEN, Woburn, USA
Asialo GM1 (Kaninchen)	Depletion der NK-Zellen im Tierversuch	Wako Chemicals GmbH, Neuss, Deutschland

3.1.8 Kommerzielle Kits

Tabelle 8: Kommerzielle Kits

Kit	Hersteller
BigDye [®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt Deutschland
DNeasy [®] Blood and Tissue Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
NucleoBond [®] PC100/PC 500	Machery-Nagel, Düren, Deutschland
NucleoBond [®] Xtra Midi	Machery-Nagel, Düren, Deutschland
NucleoSpin [®] Extract II	Machery-Nagel, Düren, Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Quickchange II site directed mutagenesis kit	Stratagene, La Jolla, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

3.1.9 Enzyme

Tabelle 9: Verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
Phusion [®] High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/ μ l)	New England BioLabs, Frankfurt am Main, Deutschland
Pfu DNA Polymerase recombinant (5 U/ μ l)	Fermentas, St.Leon-Roth, Deutschland
Platinum Taq Polymerase (5 U/ μ l)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Restriktionsenzyme	Fermentas, St.Leon-Roth, Deutschland
Shrimp Alkalische Phosphatase (1 U/ μ l)	Fermentas, St.Leon-Roth, Deutschland
T4 DNA Ligase (5 U/ μ l)	Fermentas, St.Leon-Roth, Deutschland
Turbo [™] DNase (2 U/ μ l)	Ambion, Darmstadt, Deutschland
TaKaRa ExTaq [™] Polymerase	Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich

3.1.10 DNS-Standards

Zur Bestimmung der Größe von DNS-Fragmenten bei der Gelelektrophorese wurden die drei DNS-Marker *1 kB DNA Ladder*, *100 Bp DNA Ladder* und *Lambda Mix Marker 19* von Fermentas (St.Leon-Roth, Deutschland) verwendet.

3.1.11 Chemikalien

Soweit Chemikalien hier nicht gesondert aufgeführt sind, wurden sie von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (München, Deutschland) oder Applichem (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

Tabelle 10: Chemikalien, die nicht von Carl Roth, Sigma-Aldrich oder Applichem bezogen wurden

Chemikalie	Hersteller
Bacto Trypton	DIFCO, Lawrence, USA
Deoxyribonucleotid-Mix, je 10 mM dGTP, dCTP, dATP, dTTP	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
FKS (Fötale Kälberserum)	PAN GmbH, Aidenbach, Deutschland
Gelred	Biotrend, Köln, Deutschland
Hefeextrakt	DIFCO, Lawrence, USA
HPLC-gereinigtes Wasser (H ₂ O _{PCR-GRADE})	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim, Deutschland
Oligo dT-Primer	Fermentas, St.Leon-Roth, Deutschland
Penicillin/Streptomycin-Lösung	PAN GmbH, Aidenbach, Deutschland
RiboLock™ RNase Inhibitor	Fermentas, St.Leon-Roth, Deutschland
λ-DNA	Fermentas, St.Leon-Roth, Deutschland

3.1.12 Oligonukleotide (Primer) und Sonden

Alle Oligonukleotide (siehe Tabelle 11) waren entsalzt und wurden in lyophilisiertem Zustand von der Firma Invitrogen bezogen. MGB-Taqman-Sonden wurden von Applied Biosystems und alle weiteren in der Taqman-PCR verwendeten Sonden von TIBMOL bezogen. Die Oligonukleotide wurden als 100 µM Stocklösung bei -20 °C gelagert und vor der Verwendung auf 10 µM verdünnt. Die Sonden wurden direkt auf eine Konzentration von 10 µM verdünnt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Tabelle 11: Verwendete Primer zur PCR-Amplifikation Sequenzierung und Mutagenese

Primername	Sequenz 5'->3'	Verwendung
RCTL qPCR fw	CCCATGAGGATTACATCAGATTTGC	qPCR
RCTL qPCR rev	GTAGAACAAAGCTGGCAACGG	qPCR
RCTL-Sonde	FAM -CAACTACTCGCTTTCTAT- BBQ	FAM markierte qPCR MGB-Sonde mit BBQ-Quencher
C2D5 qPCR fw	AGACCCTCTGTAAGGAACAAGG	qPCR
C2D5 qPCR rev	AGGTGTAGCTGTTGGGCTTC	qPCR
C2D5-Sonde	NED -TCAGGTTACTGGTTCG- BBQ	NED markierte qPCR MGB-Sonde mit BBQ-Quencher
rClrb qPCR fw	GCAGATACAAAGGGAGTTTTGATT	qPCR
rClrb qPCR rev	CTACAGCTCCATCTTTTGTCTGC	qPCR
rClrb-Sonde	VIC -CCTACCTGAACGACATC- BBQ	VIC markierte qPCR MGB-Sonde mit BBQ-Quencher
gb qPCR fw	CAGGCCATCAGAACGGATC	qPCR
gb qPCR rev	TCACTCCCCGATGCGTTATA	qPCR
gb-Sonde	FAM -CACAAACGTTGCGGTCAGACTTTTCGAC- TAMRA	FAM markierte qPCR Sonde mit TAMRA-Quencher
c-myc qPCR fw	GCCAGAGGAGGAACGAGCT	qPCR
c-myc qPCR rev	GGGCTTTTCATTGTTTTCCA	qPCR
c-myc Sonde	FAM -TGCCCTGCGTGACCAGATCC- TAMRA	FAM markierte qPCR Sonde mit TAMRA-Quencher
RCMV-E term1	AGACCGTAGCGACATATGAG	Bestimmung der Termini
RCMV-E term2	GTGGTCGAAACGCGATAGGG	Bestimmung der Termini
M13 fw	GTAAAACGACGGCCAG	Sequenzierung
M13 rev	CAGGAAACAGCTATGAC	Sequenzierung
pstKSR-Mut NheI fw	CAAGGTCTGCAATGCGATAGCCCATGGGTATGG	Quickchange Mutagenese
pstKSR-Mut NheI rev	CCATACCCATGGGCTATCGCATTGCAGACCTTG	Quickchange Mutagenese
pstKSR Seq fw	CAATGCGCTAGGCCATGGGTATGG	Sequenzierung
pstKSR Seq rev	CCATACCCATGGCCTAGCGCATTG	Sequenzierung
GPO-3	GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT	Mykoplasmen-Test
MGSO	TGCACCATCTGCTACTCTGTAAACCTC	Mykoplasmen-Test

3.1.13 Selbst hergestellte Puffer und Lösungen

Puffer wurden, sofern nicht anders erwähnt, stets mit zweifach destilliertem Wasser (ddH₂O) angesetzt. Lösungen zur Verwendung in der Zellkultur wurden nach dem Ansetzen mittels 0,22 µm Filtern sterilfiltriert oder autoklaviert.

Tabelle 12: Selbst hergestellte Puffer und Lösungen

Puffer/Lagerung	Zusammensetzung	Verwendung
S1 (Resuspendierpuffer) 4 °C	50 mM Tris-HCl (pH 8,0) 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A	Plasmidpräparation
S2 (Lysispuffer) Raumtemperatur	200 mM NaOH 1 % SDS	Plasmidpräparation
S3 (Neutralisationspuffer) 4 °C	2,8 M Kaliumacetat pH 5,1	Plasmidpräparation
RNase A Stocklösung -20 °C	10 mg/ml RNase 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) 10 mM NaCl	Plasmidpräparation
10 x TBE Raumtemperatur	890 mM Tris Base 890 mM Borsäure 2 mM EDTA	Gelelektrophorese
6 x DNS-Ladepuffer Aliquots bei -20 °C	0,2 % Orange G 60 mM EDTA 60 % Glycerin	Gelelektrophorese
VS-B-Puffer 4° C	50 mM Tris-HCl (pH 7,8) 10 mM KCl 5 mM EDTA	Viruslagerung
VS-B-Sucrose 4° C	50 mM Tris-HCl (pH 7,8) 10 mM KCl 15 % Sucrose 5 mM EDTA	Virusaufreinigung
Methylcellulose Medium 4 °C	8,8 g Methylcellulose 250 ml ddH ₂ O 250 ml 2 x DMEM	Virustitration

Puffer/Lagerung	Zusammensetzung	Verwendung
Methylenblaufärbelösung Raumtemperatur	500 mM NaCH ₃ COO 0,4 % Methylenblau 0,1 % NaN ₃	Virustitration
HeBS Raumtemperatur	300 mM NaCl 50 mM HEPES 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,05	Transfektion
Zelllysispuffer Raumtemperatur	0,5 % SDS 10 mM EDTA 50 mM Tris pH 8,0	DNS-Isolation aus infizierten REFs zur Bestimmung der RCMV-E Termini
STE-Puffer Raumtemperatur	0,2 % SDS 10 mM EDTA 100 mM NaCl 20 mM Tris pH 8,0	DNS-Isolation aus infizierten REFs zur Bestimmung der RCMV-E Termini
TE-Puffer Raumtemperatur	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA pH 8,0	Verdünnungsreihen für qPCRs
PBS _{ohne}	140 mM NaCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 2,7 mM KCl 1,8 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4	Zellkultur

3.1.14 Verbrauchsmaterial

Tabelle 13: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
0,22 µm Sterilfilter	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Cryoröhrchen	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Elektroporationsküvetten	Eurogentec, Köln, Deutschland
Glaswaren	Schott, Mainz, Deutschland
Pipettenspitzen	VWR, Darmstadt, Deutschland Neolab, Heidelberg, Deutschland
Plastikwaren für Zell-und Bakterienkultur	Hartenstein, Würzburg, Deutschland Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland TPP, Trasadingen, Schweiz
Reaktionsgefäße	VWR, Darmstadt, Deutschland
Spritzen	GE Healthcare, München, Deutschland
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Taqmanplatten	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckman, München, Deutschland
Zellkulturschaber	TPP, Trasadingen, Schweiz
Phase-Lock Tubes Heavy	(Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

3.1.15 Geräte

Tabelle 14: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
ABI PRISM™ Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Bakterienschüttler Certomat® R	B. Braun Biotech International, Melsungen, Deutschland
Fastprep Homogenisator	Thermo Fischer, Hamburg, Deutschland
Geldokumentationssystem	INTAS, Göttingen, Deutschland
Gelelektrophoresekammer	Biometra, Göttingen, Deutschland
Gene Pulser XCell	Bio-Rad, München, Deutschland
Glaspipetten (5 ml, 10 ml, 20 ml)	Brand, Wertheim, Deutschland
Heizschüttler	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Inverted Microscope Axiovert 200M	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Kühltischzentrifuge Heraeus Fresco 21	Thermo Fischer, Hamburg, Deutschland
Kühlzentrifuge Sorvall® RC 5C Plus	Thermo Fischer, Hamburg, Deutschland
Magnetrührer MR2002	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Nanodrop Spectrophotometer	Kühn & Bayer, Nidderau, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Marienfeld Lauda-Königshofen, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Roth, Karlsruhe, Deutschland
pH-Meter inoLab pH720	WTW, Weilheim, Deutschland
Photometer Ultraspec 10	GE Healthcare, München, Deutschland
Pipettboy acu	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Pipetten 0,2 - 1000µl	Gilson, Middleton, USA
Spannungsgeräte	Biometra, Göttingen, Deutschland
Tischzentrifuge (Heraeus)	Thermo Fischer, Hamburg, Deutschland
Ultrazentrifuge Optima L100K	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Vakuumpumpe	VWR, Darmstadt, Deutschland
Zellkulturinkubator (Heraeus B136220 CU)	Thermo Fischer, Hamburg, Deutschland
SW32Ti-Rotor	Backman, Fullerton, USA

3.1.16 Tiere

Die zur *in vivo* Untersuchung verwendeten Ratten stammen alle von Charles River (Sulzfeld; Deutschland). Sowohl die Tiere vom Stamm Sprague Dawley (SD) als auch vom Stamm WAG waren weiblich und zwischen 4 und 6 Wochen alt.

3.1.17 Programme

Tabelle 15: Verwendete Programme

Programm	Hersteller
Lasergene 8.0	DNASTAR, Madison/USA
Geneious 5.4	Biomatters, New Zealand
MS Office 2003/2007	Microsoft
MxPro 4.01	Stratagene

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung von Bakterien

Bakterielle Flüssigkulturen wurden mit einer Einzelkolonie *E.coli* angeimpft und über Nacht (üN) bei 37 °C und 220 rpm in einem Inkubationsschüttler bebrütet. Bakterien, die Plasmide basierend auf pST76KSR enthielten, wurden bei einer Temperatur von 30 °C inkubiert. Zur Vereinzelnung von Bakterien aus Flüssigkulturen wurden entweder Einzelkolonien oder ca. 100 µl der Transformationsansätze auf LB-Agarplatten ausgestrichen und bei entsprechenden Temperaturen üN inkubiert. Bei Bedarf wurden den Medien die nötigen Antibiotika zu Selektion zu gesetzt.

3.2.2 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Sämtliche verwendeten Geräte und Puffer wurden auf 4 °C bzw. im Eiswasserbad vorgekühlt. Eine Kolonie des entsprechenden *E. coli*-Stamms wurde in 50 ml LB-Medium angeimpft und üN bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Mit 10 ml der Vorkultur wurden in einem 500 ml Erlenmeyer-Kolben mit 200 ml Medium gegeben und bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,65 wurden die Bakterien bei 5.000 g und 4 °C 10 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das verbleibende Zellpellet wurde in zwei Waschschritten, in 100 ml bzw. 75 ml eisgekühltem sterilen Wasser durch Schwenken resuspendiert und unter identischen Bedingungen wie oben beschrieben zentrifugiert. Für einen finalen Waschschriff wurde das Pellet in 10-prozentigem, sterilem eisgekühltem Glycerol aufgenommen, in ein 50 ml Falcon Tube überführt und bei 4.000 g und 4 °C 10 min pelletiert. Nach dem letzten Waschschriff wurden die Zellen in 1,2 ml des gekühlten 10-prozentigem Glycerols aufgenommen, in 50 µl Aliquots aufgeteilt und entweder sofort verwendet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

3.2.3 Transformation von Bakterien durch Elektroporation

Für die Rekombinationsversuche wurden zur Erhöhung der Effizienz die kompetenten Bakterien meist direkt im Anschluss an ihre Herstellung verwendet. Im Falle der schockgefrorenen Bakterien wurden diese zunächst schonend auf Eis aufgetaut. Unmittelbar vor der Elektroporation wurden die Bakterien mit der zu transformierenden DNS versetzt und in Küvetten mit einer Spaltenbreite von

0,2 cm pipettiert. Die Elektroporation erfolgte bei einer Spannung von 2,5 kV, einer elektrischen Kapazität von 25 μ F, einem Widerstand von 200 Ω und einer Zeitkonstanten von ca. 5 ms (Lee et al., 2001). Unmittelbar nach der Transformation wurden die Bakterien mit 1 ml LB₀-Medium aus der Küvette ausgespült, in ein 2 ml Eppendorf-Cup überführt und 1 h bei 37 °C und 600 rpm in einem Eppendorf Heizschüttler inkubiert. 100 μ l des Transformationsansatzes wurden auf entsprechende Selektionsplatten ausgestrichen und üN bei 37 °C inkubiert. Bei Bedarf wurden die restlichen 900 μ l abzentrifugiert, in ca. 100 μ l aufgenommen und ebenfalls plattiert.

3.2.4 RecA-vermittelte homologe Rekombination in *E. coli*

Die RecA-vermittelte Rekombination wurde dazu verwendet, die bei der Insertion der BAC-Kassette aufgetretene 8,8 kBp-Deletion, zwischen den Leserahmen e128 und e139 im RCMV-E Δ BAC zu reparieren. Hierzu wurde der Transfervektor pSt76KSR-NheI kloniert. Dieser enthielt nebst des deletierten Fragments flankierende, im Genom nicht deletierte Bereiche zur homologen Rekombination. In Abbildung 3 sind die einzelnen Schritte schematisch dargestellt.

Die Reinfektion wurde in DH10B-Bakterien durchgeführt, die bereits den RCMV-E Δ BAC enthielten. Kompetente DH10B wurden mit dem Transfervektor pSt76KSR-NheI transformiert und ca. 24 h bei 30 °C auf LB_{Cam/Kan}-Platten inkubiert (Abbildung 3 A). In diesem Zeitraum vermittelte RecA die homologe Rekombination des BAC mit dem Transfervektor. Das gebildete Kointegrat trug sowohl die Kanamycin-, als auch Chloramphenicol-Resistenz-vermittelnden Sequenzen (Abbildung 3 B). Um diese Bakterien von jenen zu trennen, die noch über beide Plasmide verfügten, wurden Kolonien gepickt und bei 43 °C auf LB_{Cam/Kan}-Platten üN inkubiert (Abbildung 3 C). Der temperatursensitive *origin* (rep) des Transfervektors verhindert dessen Vermehrung bei Temperaturen über 40 °C. Nach diesem Selektionsschritt trugen sämtliche Bakterien das Kointegrat. Zur Auflösung dieses Kointegrats wurden die Bakterien üN bei 37 °C auf LB_{Cam}-Platten inkubiert (Abbildung 3 D). Da hier kein direkter Selektionsdruck auf die Exzision des Transfervektors angelegt werden konnte, war der Anteil an komplettierten RCMV-E BACs sehr niedrig (Abbildung 3 E). Die Kointegrat-tragenden Bakterien waren jedoch aufgrund des Levansucrasegens *sacB* in Anwesenheit von 5 % Sucrose nicht überlebensfähig und konnten durch Inkubation auf

LB_{Cam/5%Suc}-Platten größtenteils eliminiert werden (Abbildung 3 F). Da diese Selektion nicht in allen Fällen den gewünschten Effekt zeigte, wurden sämtliche Klone zeitgleich auf LB_{Cam}- und LB_{Kan}-Platten plattiert. Klone, die ausschließlich auf Platten mit Chloramphenicol wuchsen, enthielten entweder den Ausgangs-BAC RCMV-E ΔBAC oder den gewünschten, vollständigen RCMV-E BAC (Abbildung 3 G). Eine Unterscheidung zwischen beiden Varianten wurde durch Präparation und Restriktionsverdau vorgenommen.

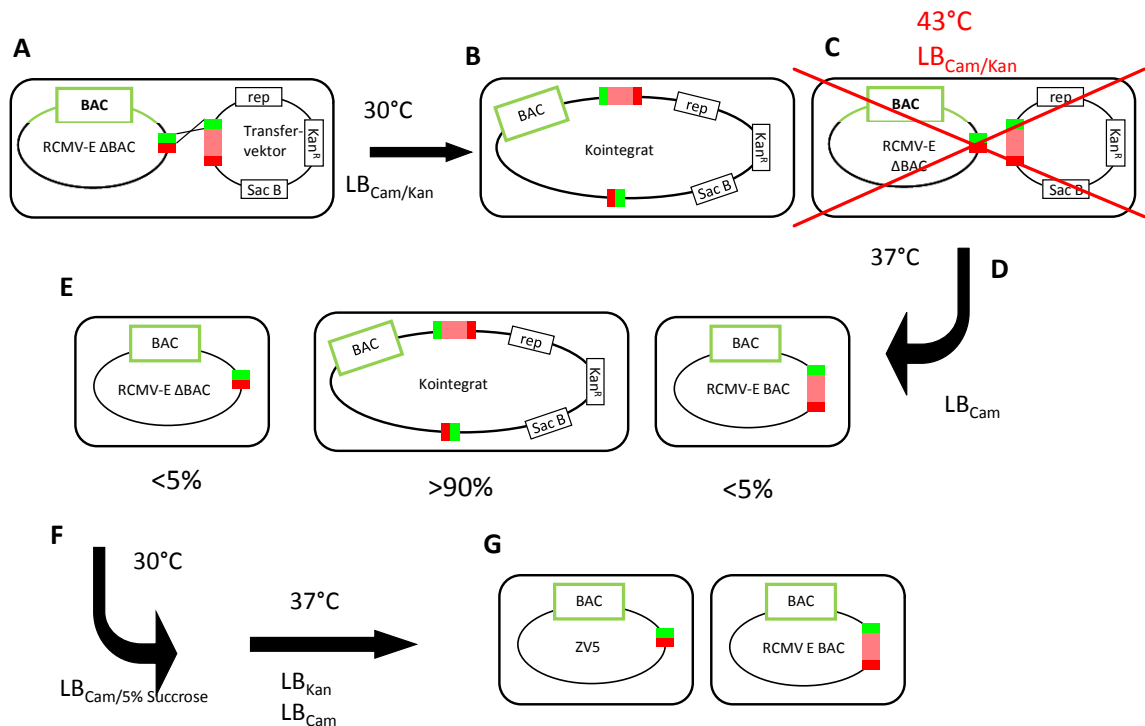


Abbildung 3: Schema der RecA-vermittelten Rekombination in *E. coli*.

Die homologen Bereiche zur Rekombination sind grün bzw. rot und das im RCMV-E ΔBAC deletierte Fragment hellrot dargestellt. In Boxen sind die für die Rekombination wichtigen Genkassetten des Transfervektors wiedergegeben.

Dieses Verfahren wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt, um das Risiko unerwünschter Nebenmutationen zu minimieren. Aus jedem Ansatz wurde ein BAC ausgewählt und für die weitergehenden Charakterisierungen verwendet.

3.2.5 Präparation von Plasmid-DNS aus *E. coli* mittels alkalischer Lyse

Kleine Mengen von Plasmid-DNS zur Charakterisierung hergestellter Klone wurden aus Übernachtskulturen nach dem Prinzip der alkalischen Lyse in Gegenwart des Detergenz SDS gewonnen.

Für die Präparation von *high copy* Plasmiden wurden 2 ml bzw. für BAC-Minis 2 x 2 ml einer Übernachtskultur in 2 ml Eppendorfgefäß überführt, 1 min bei

ca. 13.000 g in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert, das Medium entfernt und das Zellpellet in 300 µl Puffer S1 resuspendiert. Der Aufschluss der Bakterienmembran erfolgte durch Zugabe von 300 µl Puffer S2. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße vorsichtig geschwenkt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Fällung von Proteinen und Zellwandbestandteilen wurden 300 µl des eisgekühlten S3-Puffers zum Ansatz dazu gegeben und dieser 10 min auf Eis gestellt.

Durch die schnelle Neutralisierung des alkalischen Lysepuffers blieben die Proteine denaturiert, während Plasmide renaturierten. Die genomische DNS aggregierte mit den Proteinen und Teilen der Lipidmembran und wurde anschließend durch 15-minütige Zentrifugation bei ca. 13.000 g von der löslichen Fraktion getrennt. Der plasmidhaltige Überstand wurde in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, das Pellet verworfen, mit 600 µl Isopropanol versetzt und 30 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Präzipitat wurde mit 1 ml 70-prozentigem Ethanol gewaschen, erneut 5 min bei ca. 13.000 g zentrifugiert, das Pellet im Vakuum getrocknet und in 30 - 50 µl H₂O aufgenommen. Für Restriktionsanalysen wurden zwischen 5 und 26 µl der DNS-Präparation in 30 µl Ansätzen verdaut.

3.2.6 Präparation von Plasmid-DNS aus *E.coli* mittels kommerzieller Kits

Für Transformation, Transfektion und Sequenzierungen wurde ausschließlich Säulen-gereinigte Plasmid-DNS verwendet. Für die Aufreinigung von *high copy* und *low copy*-Plasmiden wurden die Kits *NucleoBond[®] Xtra Midi*, *NucleoBond[®]-AX 100* und *NucleoBond[®]-AX 500* verwendet. Mit Ausnahme der BAC-Präparationen erfolgte die Präparation nach Herstellervorgaben. Für BACs wurden 200 ml einer über Nacht gewachsener Bakterienkulturen verwendet. Die Aufreinigung erfolgte ausschließlich mit dem Kit *NucleoBond[®]-AX 100* und das Herstellerprotokoll wurde dahingehend modifiziert, dass von den Puffern S1, S2 und S3 12 ml anstelle der empfohlenen 8 ml verwendet wurden. Alle anderen Schritte wurden unverändert durchgeführt.

3.2.7 Bestimmung der DNS-Konzentration mittels Nanodrop

Die Konzentration der DNS-Lösungen wurde mit einem Nanodrop-Photometer bestimmt. Bei der Messung wurden 2 µl Probe eingesetzt und ein Absorbitionspektrum von 230 nm bis 300 nm aufgenommen. Durch die Bestimmung der optischen Dichte bei den Absorptionsmaxima von DNS (260 nm) und Proteinen (280 nm) lassen sich die DNS-Konzentration (1 OD = 50 µg/ml) und der Reinheitsgrad durch den Quotient OD_{260}/OD_{280} berechnen (Sambrook & Russell, 2000). Für reine DNS ist ein Quotient von 1,8 - 2,0 zu erwarten.

3.2.8 Isolierung von DNS aus tierischem Gewebe

Die Isolierung viraler und zellulärer DNS aus Gewebe erfolgt unter Verwendung des DNeasy Tissue Kits. Hierzu wurden 10 mg der Milz bzw. 25 mg Leber in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 150 µl ATL-Puffer gegeben. Mittels eines passenden Homogenisators wurde das Gewebestück gequetscht, um die anschließende Lyse zu erleichtern. Nach Zugabe von 20 µl Proteinase K (20 mg/ml) erfolgte die Lyse bei 55 °C für 3 h bzw. üN in einem Eppendorf Heizschüttler. Nach Zugabe von 20 µl RNase A (20 mg/ml) und einer Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur wurden 200 µl AL-Puffer zugegeben, die Proben bis zur vollständigen Lyse gevortext und für 10 min auf 70 °C erhitzt. Vor dem Auftrag des Lysats auf die Säule wurden unlösliche Aggregate mit einer Pipette abgezogen und die Probe mit 200 µl reinem Ethanol vermischt. Das Lysat wurde auf die Säulen gegeben und bei ca. 8.000 g für 1 min zentrifugiert. Anschließend folgten zwei Waschschrte mit den Puffern AW1 (8.000 g, 1 min) und AW2 (13.000 g, 5 min). Die Elution erfolgte mit 200 µl auf 70 °C vorgewärmten AE-Puffer. Bis zur quantitativen Bestimmung des Virustiters wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

3.2.9 Isolierung von RNS aus Zellkultur und tierischem Gewebe

RNS wurde mittels des *RNeasy-Kits* nach Herstellerangaben isoliert. Für die Isolation aus Zellen wurden 1×10^6 Zellen in einer 6-Loch-Platte ausgesät und gegebenenfalls infiziert. Zur Isolation wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst, gewaschen, in 600 µl RLT-Puffer aufgenommen und dadurch lysiert. Zur Isolation von RNS aus Organmaterial wurden 10 mg (Milz) bis 20 mg (Leber) Gewebe homogenisiert und ebenfalls RLT-Puffer aufgenommen.

Das Lysat wurde zunächst mit dem gleichen Volumen an 70 prozentigem Ethanol versetzt, gut gemischt, auf die Säule aufgetragen und 1 min bei ca. 10.000 g zentrifugiert. Vor dem Verdau von DNS-Kontaminationen wurde die an die Säule gebundene RNS mit 350 µl RW1 gewaschen. Der DNase-Verdau erfolgte auf der Säule mittels des im Kit enthaltenen *RNase free DNase Set*. Dazu wurden je Säule 10 µl gelöste DNase mit 70 µl RDD gemischt, direkt auf die Filtermembran gegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten ein Waschschrift mit 500 µl RW1-Puffer und zwei mit je 500 µl RPE-Puffer. Zur Entfernung etwaiger Ethanol-Rückstände wurden die Säulen vor der Elution durch Zentrifugation (1 min, 10.000 g) getrocknet. Die Elution erfolgte zur Erhöhung der Ausbeute, in auf 65 °C vorgeheiztem H₂O_{PCR-Grade}. Nach Bestimmung der Konzentration mittels Nanodrop wurde die isolierte RNS bei -80 °C gelagert.

3.2.10 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist ein Verfahren zur exponentiellen *in vitro* Vermehrung definierter Nukleotidsequenzen. Für Klonierungen wurden die Primer mit passenden Restriktionsschnittstellen versehen. Tabelle 16 zeigt das Standardpipettierschema einer PCR, von dem nur in Einzelfällen abgewichen wurde.

Tabelle 16: Exemplarisches Pipettierschema einer PCR

Reagenz	Konzentration	Zugegebenes Volumen	Enkonzentration
Puffer [200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl]	10x	2,00 µl	1x
MgCl ₂	50 mM	2,00 µl	5 mM
dNTPs	10 mM	1,00 µl	0,5 mM
Sense Primer	10 µM	0,75 µl	0,375 µM
Antisense Primer	10 µM	0,75 µl	0,375 µM
Platinum TaqPolymerase	5 U/µl	0,20 µl	0,5 U/µl
Template-DNS	100 – 300 ng	X µl	
H ₂ O _{PCR-GRADE}		ad 20 µl	

Die PCR-Reaktionen wurden in einem programmierbaren Thermocycler durchgeführt. Tabelle 17 zeigt das allen Klonierungs- und Nachweis-PCRs zugrunde liegende Temperaturprofil.

Tabelle 17: Temperaturprofil der Klonierungs- und Nachweis-PCRs

Temperatur	Zeit	Wiederholungen
95 °C	5 min	25 - 35
95 °C	20 s	
TM -5 °C	30 s	
72 °C	1 min/kBp	
72 °C	7 min	
4 °C	∞	

3.2.11 Quickchange-PCR zum Einfügen von Punktmutationen

Zum Einfügen von Punktmutationen wurde eine Quickchange-PCR durchgeführt. Dabei wurde mittig in zwei 30 - 40 Bp lange komplementäre Oligonukleotide die gewünschte Mutation eingefügt und eine 10 - 20 Zyklen umfassende PCR mit der *proofreading-polymerase pfu* durchgeführt (Protokoll siehe Tabelle 18). Die Template-DNS ohne Mutation war durch die Isolierung aus *E.coli* methyliert und konnte durch einen Restriktionsverdau mit *DpnI* aus dem Ansatz entfernt werden. Zwischen 1 und 5 µl der nicht methylierten PCR-Produkte wurden, wie unter 3.2.2 beschrieben, transformiert und die DNS isoliert. Zur Bestätigung der Mutation wurde die isolierte DNS sequenziert.

Tabelle 18: Temperaturprofil der Quickchange-PCR

Temperatur	Zeit	Wiederholungen
95 °C	5 min	10 - 20
95 °C	20 s	
TM -5 °C	30 s	
68 °C	1 min/kBp	
68 °C	7 min	
4 °C	∞	

3.2.12 Herstellung von cDNS durch reverse Transkription

Durch reverse Transkription wurde aus zuvor isolierter RNS eine komplementäre DNS (cDNS) gewonnen, die im Anschluss für Klonierungen und Taqman-PCRs verwendet wurde. Die Herstellung von cDNS wurde mittels *RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase* durchgeführt. Die Synthese erfolgte nach Herstellerangaben unter Verwendung von 100 bis 500 ng RNS in einem Drei-Schritt-Protokoll in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Das Pipettierschema und das Reaktionsprotokoll sind in Tabelle 19 angegeben. Am Ende der Reaktion erfolgte eine Hitzeinaktivierung der reversen Transkriptase (RT) für 10 min bei 70 °C. Die synthetisierte cDNS wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Zum Ausschluss von Kontaminationen wurde neben einer H₂O-Kontrolle von jeder RNS-Probe auch ein Reaktionsansatz angefertigt, bei dem keine RT zugegeben wurde.

Tabelle 19: Pipettierschema und PCR-Protokoll einer reversen Transkription.

Reagenz	Konzentration	Endkonzentration	Inkubation
100 - 500 ng RNS			70 °C, 5 min
Oligo dT (18mer)	0,5 µg/µl	25 ng/µl	
Reaktions-Puffer	5x	1x	37 °C, 5 min
dNTPs	10 mM each	1 mM each	
RiboLock™ RNase Inhibitor	40 U/µl	2 U/µl	
RevertAid™ RT	200 U/µl	100 U/µl	42 °C, 60 min

3.2.13 Sequenzierungs-PCR

Sequenzierungsreaktionen wurden mittels *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* durchgeführt, im hauseigenen Sequenzierlabor aufgereinigt und ausgelesen. Die unterschiedlichen Reaktionsansätze zur Sequenzierung von Plasmiden bzw. BAC- und Virion-DNS sind in Tabelle 20 angegeben. Das Temperaturprofil war für alle Ansätze identisch und ist in Tabelle 21 dargestellt.

Tabelle 20: Pipettierschema einer Sequenzierungs-PCR

Reagenz	Plasmid	BAC/Virion-DNS
DNS	100 ng	3 µg
5x Puffer	1,5 µl	3,0 µl
Primer (10µM)	0,5 µl	0,5 µl
BigDye 3.1	1,0 µl	2,0 µl
ad H ₂ O _{PCR-GRADE}	10 µl	20 µl

Tabelle 21: Temperaturprofil einer Sequenzierungs-PCR

Temperatur	Zeit	Wiederholungen
95 °C	5 min	35
95 °C	10 s	
TM -5 °C	30 s	
60 °C	4 min	
4 °C	∞	

3.2.14 Bestimmung der Genomtermini

Zur Bestimmung der Genomtermini wurde aus infizierten Zellen das zirkuläre Virusgenom gewonnen. Hierzu wurden 1×10^7 REF in einer 175 cm²-Zellkulturflasche mit einer moi von 1 infiziert und nach 8 h geerntet. Die Zellen wurden bei 380 g für 5 min pelletiert und 15 min bei Raumtemperatur in Zelllysispuffer lysiert. Zur Fällung der chromosomalen DNS wurden 500 µl 5 M NaCl zugegeben, das Lysat ün bei 4 °C inkubiert und am nächsten Morgen durch Zentrifugation (15 min, 4 °C, 13.000 g) vom ÜS getrennt. Die extrachromosomale DNS wurde durch Zugabe von 2 ml Isopropanol und Inkubation für 2 h bei -20 °C präzipitiert und wie oben zentrifugiert. Das gewonnene Pellet wurde in STE-Puffer unter Zugabe von Proteinase K (50 µg/ml) aufgenommen und für 30 min bei 65 °C inkubiert. Nach der Phenol/Chloroform-Extraktion wurde der wässrige ÜS abgenommen und mit dem 2,5-fachen Volumen an 96 % EtOH versetzt, 60 min bei -20 °C inkubiert, die DNS durch Zentrifugation pelletiert und nach Trocknung in 20 µl TE-Puffer (inkl. RNase 15 µg/ml) aufgenommen. Zur PCR-Amplifikation wurden 1 µg der isolierten DNS mit den Primern *RCMV-E term1* und *RCMV-E term2* (je 0,375 µM) unter Verwendung der TaKaRa ExTaqT Polymerase (5 U im Ansatz) und mit 0,4 nM dNTPs eingesetzt. Das Protokoll ist Tabelle 22 zu entnehmen.

Tabelle 22: PCR-Protokoll der Termini-PCR

Temperatur	Zeit	Wiederholungen
94 °C	5 min	15
98 °C	20 s	
50 °C	30 s	
68 °C	10 min	
72 °C	30 min	
4 °C	∞	

Das Amplifikat wurde in einem 0,8 % Agarose-Gel aufgetrennt und die DNS wie unter 3.2.20 und 3.2.13 beschrieben kloniert und sequenziert.

3.2.15 Quantitative real-time PCR (qPCR)

Die qPCR ist ein hochsensitives Verfahren zu Quantifizierung von DNS- oder RNS-Mengen in Lösungen. Für die in dieser Arbeit etablierten qPCR wurden ausschließlich Hydrolyse-Sonden eingesetzt. Am 5'-Ende waren die Sonden mit einem Reporterfarbstoff gekoppelt, dessen Fluoreszenz vom am 3'-Ende befindlichen Quencher absorbiert wurde. Während der Reaktion wurde die Sonde durch die Exonukleaseaktivität der *Taq*-Polymerase hydrolysiert und die Reporterfluoreszenz nicht mehr vom Quencher absorbiert. Die Zunahme der Fluoreszenz wurde nach jedem Reaktionszyklus gemessen. Als Messwert für die weitere Auswertung wurde der sogenannte Ct-Wert (*cycle threshold*) ermittelt. Dieser entsprach dem Replikationszyklus, in welchem eine vorher festgelegte Fluoreszenzintensität überschritten wurde. Je niedriger der Ct-Wert, desto höher war der Gehalt des gesuchten Gens in der analysierten Probe. Anhand einer zuvor etablierten Standardgeraden (siehe 3.2.16) mit definierten Kopienzahlen des untersuchten Gens wurde dessen Gehalt in den Versuchsproben quantitativ ermittelt. Das zelluläre Protoonkogen *c-myc* diente als Referenzgen zur Bestimmung der relativen Kopienzahl der untersuchten Gene (siehe 3.2.17).

Dieses Verfahren wurde zur Bestimmung des Expressionsprofils der endogenen Rattengene *celc2D5* und *rClr-b*, sowie des viralen *RCTLs in vitro* angewandt. Die viralen Genomäquivalente in Organproben der infizierten Tiere wurden anhand des viralen Glykoprotein B-Gens *gB* ermittelt. Die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes ist Tabelle 23 zu entnehmen.

Tabelle 23: Pipettierschema des Reaktionsansatzes je qPCR

Reagenz	c (Stock)	V in µl/Ansatz	Endkonzentration
Puffer	10x	2,5	1x
MgCl	50 mM	2,0	4 mM
dNTP	10 mM (each)	1,0	0,4 mM (each)
Primer (sense)	10 mM	0,75	0,3 mM
Primer (antisense)	10 mM	0,75	0,3 mM
Sonde	10 mM	0,25	0,1 mM
Platinum Taq	5 U/µl	0,2	1 U/µl
H ₂ O _{PCR-GRADE}		12,55	
Probe		5	

Alle qPCRs wurden auf das identische Temperaturprofil (siehe Tabelle 24) ausgerichtet, sodass die Detektion verschiedener Amplifikate in einem Lauf erfolgen konnte. Die Fluoreszenzmessung fand jeweils während des Amplifikationsschrittes bei 60 °C statt.

Tabelle 24: Temperaturprofil der qPCRs

Temperatur	Zeit	Wiederholungen
95 °C	5 min	45
95 °C	15 s	
60 °C	30 s	

3.2.16 Erstellung der Standardgeraden für qPCRs

Zur genauen Quantifizierung der Gene *c-myc*, *RCTL*, *gB*, *clec2D5* und *rClr-b* wurden plasmidbasierte Standardgeraden für den Konzentrationsbereich 1×10^6 bis 1×10^0 hergestellt. Dazu wurden zunächst die in der qPCR nachzuweisenden Fragmente in einer Standard-PCR amplifiziert und wie unter 3.2.20 beschrieben in den TOPO-TA Vektor kloniert und durch Sequenzierung verifiziert. Von diesen Plasmiden wurden Mini- bzw. Midipreps wie unter 3.2.6 beschrieben präpariert und die Ausbeute mittels Nanodrop bestimmt. Gemäß der nachstehenden Formel wurde das Gewicht eines Einzelplasmids bestimmt.

$$\frac{\text{Plasmidgröße [kBP]} \times 0,650 \mu\text{g}/\text{pmol}^a}{6,022 * 10^{23} \text{ mol}^{-1} b} = m(\text{Plasmid})[\text{g}]$$

Formel zur Berechnung des Plasmidgewichts. *a* Konstante für das durchschnittliche Gewicht eines doppelsträngigen DNS-Fragments von 1.000 BP. *b* Avogadrokonstante

Aus dem Einzelgewicht des Plasmides und der am Nanodrop ermittelten Massenkonzentration (ng/µl) wurde die Stückzahlkonzentration (Kopien/µl) der jeweiligen Präparation berechnet. So wurden zunächst Stammlösungen von 2×10^{11} Plasmiden/µl in TE-Puffer hergestellt und dann in 1 : 10-Verdünnungen bis 2×10^7 hergestellt. Die Verdünnungen für die Standardgeraden wurden zum Ausschluss von Kontaminationen in einer PCR-Mastermix Box unter Verwendung von λ-TE (TE-Puffer mit 1 ng λ-DNS/µl) hergestellt.

Um den Einfluss etwaiger Pipettierfehler zu reduzieren wurden für je Ansatz 5 µl der entsprechenden Verdünnungen zugegeben, d. h. zur Bestimmung des Ct-Wertes der Konzentration von 1×10^7 wurden 5 µl der 1×10^6 -Verdünnung zum Reaktionsansatz gegeben. Jede Standardgerade wurde in Triplikaten, basierend auf unabhängigen Verdünnungsreihen gemessen, wobei für jede Verdünnungsstufe eine Doppelbestimmung durchgeführt wurde.

3.2.17 Quantifizierung von Versuchsproben mittels qPCR

Für die Expressionsanalysen wurde die RNS wie unter 3.2.12 beschrieben in cDNS umgeschrieben. Die DNS-Präparationen aus den Organen wurden ohne weitere Vorbehandlung verwendet.

Die quantitative Bestimmung erfolgte für jedes untersuchte Gen in Duplikaten mit je 5 µl cDNS bzw. DNS. Aus den gemessenen Ct-Werten wurde der Mittelwert errechnet und anhand der Standardgeraden die tatsächliche Kopienzahl ermittelt. Die relative Kopienzahl wurde nach folgender Formel ermittelt.

$$\frac{\text{Kopienzahl des untersuchten Gens}}{\text{Kopienzahl des Referenzgens } c - myc} = \text{relative Kopienzahl}$$

3.2.18 Restriktionsverdau von Plasmid-DNS

Restriktionsverdaue von Plasmid-DNS erfolgten stets nach Angaben der Hersteller, wobei je µg DNS 1 U Enzym eingesetzt wurde. Waren Mehrfachverdaue nötig, wurde, falls möglich, ein für beide Enzyme geeigneter Puffer verwendet, oder die DNS nochmals aufgereinigt und ein zweites Mal verdaut.

3.2.19 Dephosphorylierung von Plasmid-DNS und Ligation

Alkalische Phosphatase dient der Dephosphorylierung von Vektoren vor einer Insertionsligation. Da die T4-DNS-Ligase nur 5'-Phosphat-Enden mit 3'-OH-Enden verknüpft, wird durch die Behandlung gespaltener Vektor-DNS mit alkalischer Phosphatase eine Rezirkularisierung des Vektors bei der Ligationsreaktion reduziert.

Nach 1 h Restriktionszeit wurden dem Ansatz 1 U Shrimp Alkalische Phosphatase zupipettiert und weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Der Dephosphorylierungsansatz wurde über ein Agarosegel aufgetrennt, gereinigt und für die Ligation verwendet. Der Standardligationsansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 µl enthielt 3 µl des gereinigten Vektors, 7 µl des Inserts, 5 U (1 µl) T4-DNA-Ligase,

2 µl Ligationspuffers und 7 µl H₂O_{PCR-GRADE}. Die Ligation erfolgte entweder 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht im schmelzenden Eisbad. Von diesem Ligationsansatz wurden 1 µl - 10 µl in kompetente *E.coli* transformiert.

3.2.20 TOPO TA-Klonierung

Mittels des *TOPO TA Cloning Kit* wurden die Plasmide konstruiert, welche als Grundlage zur Erstellung der Standardgeraden der qPCRs dienen. Nach PCR-Amplifikation des in der qPCR nachzuweisenden Fragments mit einer Taq-Polymerase wurde das Produkt vor der Ligation, wie unter 3.2.21 und 3.2.22 beschrieben, aufgereinigt. Der Ligationsansatz erfolgte nach Herstellerangaben und ist in Tabelle 25 dargestellt.

Tabelle 25: TOPO TA Klonierungsansatz

Reagenz	Volumen
PCR-Amplifikat	4,5 µl
Verdünnte Salzlösung	1 µl
pCR2.1-TOPO-Vektor	0,5 µl

Nach einer Reaktionszeit von 30 min bei Raumtemperatur wurden 1 µl bzw. 5 µl wie unter 3.2.3 beschrieben in *E.coli* DH10B transformiert. Die Plattierung erfolgte auf LB_{Amp}-Platten inklusive IPTG (0,2 M) und X-Gal (40 µg/ml). Potentiell positive Klone konnten mittels „Blau-Weiß“-Screening identifiziert werden.

3.2.21 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung linearisierter DNS-Fragmente (0,1 kbp bis 10 kbp) hinsichtlich ihres Molekulargewichtes erfolgte in Agarosegelen bei konstanter Stromstärke und einer Spannung zwischen 50 V und 150 V. Je nach Größe der zu trennenden Fragmente wurden zwischen 0,5 % und 2 % Agarose in 1xTBE-Puffer durch Aufkochen gelöst und anschließend mit Gelred im Verhältnis 1:25.000 versetzt. Vor dem Auftragen auf das Gel wurde den DNS-Proben 6 x DNS-Ladepuffer zugesetzt. Die Detektion der DNS erfolgte mit Hilfe eines UV-Durchlichtschirmes. Restriktionsanalysen von BAC- oder Virion-DNS wurden auf 0,6 % TBE-Gelen aufgetragen und liefen über Nacht bei 55 V.

3.2.22 Aufreinigung von DNS-Fragmenten

DNS-Fragmente aus der PCR oder anderen enzymatischen Reaktionen wurden mit dem *QIAquick[®] PCR Purification Kit* oder gemäß den Angaben des Herstellers aufgereinigt. DNS-Moleküle mit Größen zwischen 100 Bp und 10 kbp wurden

dadurch von Enzymen, Salzen, Oligo- und Einzelnukleotiden gereinigt und konnten für nachfolgende Ligationen oder Sequenzierungen verwendet werden. Die Aufreinigung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mittels *QIAquick® Gel Extraction Kit* oder *Nucleospin Extract II* nach Herstellerangaben.

3.3 Zellbiologische Arbeitsmethoden

3.3.1 Zellkultivierung

Alle Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Sofern nicht anders beschrieben, wurden Zellkulturflaschen mit Bodenflächen von 25 bis 175 cm² verwendet. Bei Erreichen einer Konfluenz der Zellen von ca. 80 % wurden die Zellen gesplittet. Hierzu wurde das Medium zunächst abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Je nach Größe der Kulturflasche wurden 1 bis 5 ml Trypsin zugegeben und die Flasche 5 bis 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Ablösen der Zellen wurde das Trypsin durch Zugabe von FKS-haltigem Medium inaktiviert und die Zellen bei 300 g für 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem Medium resuspendiert und neu ausgesät.

3.3.2 Archivierung von Zellen

Vor der Archivierung von Zellen über einen längeren Zeitraum wurden diese mittels PCR auf eine Kontamination durch Mycoplasmen getestet. Im Falle eines negativen Ergebnisses wurden die Zellen in 175 cm²-Zellkulturflaschen bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % angezüchtet. Sämtliche Flaschen wurden wie unter 3.3.1 beschrieben mit Trypsin behandelt und die Zellzahl bestimmt. Zur Langzeitarchivierung wurden Aliquots von 5 x 10⁶ Zellen in FKS inklusive 10 % DMSO für 24 h in einer mit Isopropanol gefüllten Kryobox bei -80 °C gelagert und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt. Das Auftauen der eingefrorenen Zellen erfolgte in einem 37 °C warmen Wasserbad. Die Zellen wurden einmal mit vorgewärmtem PBS gewaschen und dann im entsprechenden Medium ausgelegt.

3.3.3 CaHPO₄-Transfektion

Adhärente Zellen lassen sich effizient mit der CaHPO₄-Präzipitations-Methode (Graham et al., 1973) transfizieren. Hierbei wird ein CaHPO₄-DNS-Präzipitat über Endozytose von der Zelle aufgenommen.

Je Kavität wurden am Vortag 5 x 10⁵ REFs in 3 ml DMEM-Medium 10 % FKS ausgesät und ca. 24 h inkubiert, bis eine Konfluenz von 70 % bis 80 % erreicht

war und das Medium durch DMEM 2 % ersetzt. Für die Transfektion der Zellen wurden 10 µg *Nucleobond*-gereinigter Plasmid- bzw. Virion-DNS mit 30 µl 2,5 M CaCl₂ (sterilfiltriert) in einem Gesamtvolumen von 300 µl mit destilliertem Wasser vereint und unter Vortexen tropfenweise zu 300 µl des 2 x HeBS-Puffer pipettiert. Während des 20-minütigen Inkubationsschrittes bei Raumtemperatur bildete sich das Präzipitat aus, welches auf die REFs gegeben wurde. Anschließend wurden die Zellen für mindestens 24 h im Brutschrank kultiviert.

3.3.4 Transfektion mittels PolyFect

Zur Transfektion von REFs mittels PolyFect wurden am Vortag in einer 6-Loch-Platte 0,8 x 10⁶ REFs je Kavität in DMEM 10 % ausgelegt. 2 µg der zu transfizierenden DNS wurden mit DMEM ohne FKS auf 100 µl aufgefüllt und durch vortexen 10 s mit 20 µl PolyFect gemischt. Während der darauffolgenden 10-minütigen Inkubation wurde das Medium der Zellen abgenommen und durch 1,5 ml DMEM 2 % ersetzt. Vor der Applikation des Transfektionsgemischs wurden zu jedem Ansatz 600 µl DMEM 2 % zugegeben. Nach 24 h wurde ein Mediumswechsel durchgeführt. Alle Ansätze wurden als Doppelansätze mit einer Negativkontrolle ohne DNS und dem Plasmid pEGFP-N1 als Transfektionskontrolle durchgeführt.

3.3.5 Anzucht von Viren

Zur Vermeidung einer sukzessiven Attenuierung des RCMV-E wt durch wiederholte Passagierung in Zellkultur wurden Virusstocks stets aus demselben Ausgangsstock angeimpft.

Zunächst wurden in zehn 175 cm²-Zellkulturflaschen je 1 x 10⁶ REFs in DMEM 10 % ausgelegt. Nach 24 h wurde das Medium durch 10 ml DMEM 2 % ersetzt und die Zellen mit einer moi von 0,05 - 0,1 infiziert. Im Verlauf der ersten 60 min der Infektion wurden die Flaschen regelmäßig geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung der Viren zu erreichen. Anschließend wurden weitere 15 ml Medium zugegeben. Nach 4 d bis 5 d waren sämtliche Zellen in den Ansätzen meist vollständig infiziert. Die noch adhärenen Zellen wurden abgeschabt und zusammen mit den Überständen (ÜS) in zwei 250 ml Zentrifugenbecher gegeben und bei 6.000 g und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Die ÜS wurden in neue Zentrifugenbecher überführt und auf Eis gelagert. Die Zellen hingegen wurden zunächst in 5 ml des ÜS resuspendiert und schließlich in auf -20 °C vorgekühlten

Homogenisatoren aufgeschlossen. Die dabei entstandenen Zelltrümmer wurden bei 17.000 g und 4 °C für 20 min abzentrifugiert und die ÜS mit denen aus der ersten Zentrifugation vereinigt. Die Pelletierung der Viruspartikel erfolgte bei 27.000 g, 4 °C für 3 h. Der ÜS wurde bis auf 5 ml abgenommen und die Pellets ün zum Quellen auf Eis gelagert. Vor der Ultrazentrifugation wurden die Pellets in 5 ml ÜS aufgenommen und in auf -20 °C vorgekühlten Homogenisatoren resuspendiert. Die Ultrazentrifugation erfolgte in SW32Ti-Rotoren in einer Ultrazentrifuge vom Typ Optima L-100K bei 30.000 rpm (ca. 140.000 g) für 3 h bei 4 °C. Hierzu wurden in Polyallomerröhrchen 32 ml VSB-Sucrose vorgelegt und diese mit den 5 ml Virusüberstand überschichtet. Die erhaltenen Viruspellets wurden je nach Größe in 2 - 4 ml VSB aufgenommen und in 50 µl Aliquots bei -80 °C gelagert. Zum Ausschluss einer bakteriellen Kontamination wurde ein Aliquot in 5 ml LB₀-Medium angeimpft und ün bei 37 °C bebrütet.

3.3.6 Rekonstitution von Viren aus BACs

Zur Anzucht von Viren aus BAC-DNS wurden zunächst REFs mit 2 µg Säulengereinigter BAC-DNS wie unter 3.3.4 beschrieben transfiziert. Bei Erreichen einer Konfluenz von 100 % wurden die Zellen trypsiniert und zunächst auf 10 cm und später auf 15 cm Petrischalen umgesetzt. Nach Expansion der Zellen auf drei 15 cm Schalen waren sämtliche Zellen infiziert und der ÜS wurde abgenommen. Durch Zentrifugation bei 6.000 g für 20 min wurde der virushaltige ÜS von den Zellen getrennt und als Ausgangsstock für die Anzucht weiterer Virusanzuchten wie unter 3.3.5 beschrieben verwendet.

3.3.7 Titration von Virusstocks

Die Titration der Virusstocks erfolgte mittels Plaque-Assay. Um Abweichungen durch fehlerhafte Verdünnungsreihen auszuschließen, wurde jeder Virusstock zweimal mit unabhängigen Verdünnungsreihen titriert. Je Plaque-Assay wurde eine 24-Loch Platte mit 4×10^5 REFs je Kavität in DMEM 10 % ausgelegt und für 24h bebrütet. Je Platte wurde wie folgt eine Verdünnungsreihe von 10^{-1} bis 10^{-8} angefertigt. Ein Aliquot des Virusstocks wurde schonend auf Eis aufgetaut und 1:10 in einem Gesamtvolumen von 400 µl mit DMEM 2 % verdünnt. Durch sequenzielle 1:10 Verdünnungen wurden aus der ersten Lösung je 1 ml der Verdünnungsstufen 10^{-2} bis 10^{-8} hergestellt. Zur Titration wurde das Medium aus den Kavitäten der 24-Loch-Platte abgesaugt und 200 µl der Verdünnungen

10^{-3} bis 10^{-8} in vier horizontal angeordneten Wiederholungen aufgetragen. Nach 1 h Bebrütung bei 37 °C wurde 1 ml Methylcellulosemedium zugegeben. Die hohe Viskosität dieses Mediums verhinderte die freie Diffusion der Viren in den Ansätzen, sodass die freigesetzten Viren nur benachbarte Zellen infizieren können. Jedes eingangs vorhandene infektiöse Viruspartikel resultierte in der Ausbildung eines einzelnen Plaques. Nach Inkubation für 7 d wurde das Methylcellulosemedium ausgeklopft und die Kavitäten zweimal mit PBS + 1 % PFA gewaschen und fixiert. Die Färbung erfolgte mit 1 ml 0,04 % Methylenblaufärbelösung für 1 h bei 37 °C. Die gefärbten Platten wurden üN bei Raumtemperatur getrocknet und am nächsten Tag die Anzahl der Plaques gezählt. Die Berechnung der Titer erfolgte mit folgender Formel:

$$\frac{\text{Gezählten Plaques aller Wiederholungen (pfu)}}{\text{Anzahl der Wiederholungen}} \times \frac{1000 \mu\text{l}}{200 \mu\text{l}} \times \text{Gezählte Verdünnungsstufe} = \text{Titer } \text{pfu/ml}$$

3.3.8 Entfernung der BAC-Kassette mittels Cre-Recombinase

Zur Entfernung der BAC-Kassette aus der Virus-DNS wurde eine wie unter 3.3.4 beschriebene Transfektion mit PolyFect durchgeführt. Allerdings wurden 1,5 µg BAC-DNS und 0,5 µg des Plasmids pBRepCre gemischt und zur Transfektion eingesetzt. Das dabei resultierende Gemisch aus BAC-Viren und CRE-Viren konnte jedoch nicht zur direkten Anzucht verwendet werden. Zur Isolierung eines BAC-freien Virusklons wurde eine Verdünnungsreihe zur Virusvereinzelnung angefertigt. Hierzu wurde 1 ml Überstand in den Stufen 1×10^{-1} bis 1×10^{-7} verdünnt und REFs mit den Verdünnungsstufen 10^{-5} bis 10^{-7} im 96-Loch Format infiziert. Durch tägliche mikroskopische Kontrolle aller Ansätze wurden die Kavitäten mit nur einem einzelnen farblosen Plaque identifiziert. Diese Aufreinigung wurde ein weiteres Mal für zwei der „Einzelpaque“-Ansätze wiederholt. Dieser zweite Schritt diente dazu, eine Kontamination durch ein sehr langsam wachsendes BAC-Virus auszuschließen. Die doppelt aufgereinigten Viren wurden anschließend bis zu drei 175 cm² Zellkulturflaschen expandiert und der ÜS wie unter 3.3.5 beschrieben als Ausgangsstocks gewonnen.

3.3.9 Untersuchung der Replikationsfähigkeit von Viren durch Wachstumskurven

Zur Bestimmung der Replikationsfähigkeit wurden von jedem Virus je eine Wachstumskurve mit niedriger Infektionsdosis (moi=0,01) und hoher Infektionsdosis (moi=3) angefertigt. Alle Wachstumskurven wurden zeitgleich und in

Dreifachansätzen erhoben. Es wurden je drei BAC- und CRE-Viren mit dem RCMV-E wt verglichen. Die Meßzeitpunkte für die jeweiligen Kurven sind Tabelle 26 zu entnehmen.

Tabelle 26: Übersicht der Meßzeitpunkte der Wachstumskurven

moi=0,01	moi=3
4 h	4 h
24 h	24 h
48 h	36 h
72 h	48 h
96 h	72 h
120 h	
168 h	

Am Vortag der Infektion wurden je Virus drei Kavitäten einer 6-Loch Platte mit je $1,2 \times 10^6$ REFs in DMEM 2 % FKS ausgesät. Am Tag der Infektion wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit den errechneten Virusmengen in 1 ml DMEM 2 % FKS für 1 h infiziert. Im Anschluss wurde das Infektionsmedium wieder abgenommen und alle Ansätze dreimal mit 3 ml PBS gewaschen und je Ansatz 3 ml DMEM 2 % FKS zugegeben. Zu den Zeitpunkten 4 h (moi=0,01), 24 h (moi=0,01) und 4 h (moi=3) wurden aufgrund der erwarteten sehr niedrigen Titer je Ansatz 2 x je 1 ml ÜS abgenommen. Für alle weiteren Messpunkte wurden je Ansatz 2 x 0,5 ml entnommen. Das abgenommene Volumen wurde durch frisches Medium ersetzt und die ÜS bis zur Titration bei -20 °C gelagert. Die Infektionsdosis wurde durch Rücktitration der Ausgangsverdünnung bestätigt. Als Vitalitätskontrolle wurde während der gesamten Wachstumskurve ein Ansatz mit nicht infizierten Zellen mitgeführt.

3.3.10 Isolierung von Virion-DNS

Zur Isolierung von der DNS aus den Viruspartikeln wurden drei 175 cm²-Zellkulturflaschen bei einer Konfluenz von ca. 80 % (ca. $1,5$ bis $1,8 \times 10^7$ Zellen) mit einer moi von 1 infiziert. Nach 3 bis 4 Tagen, nach vollständiger Ausprägung des cytopathischen Effekts (CPE), wurden der Überstand und die Zellen geerntet. Dazu wurden die Flaschen liegend für mindestens 1 h bis 2 h bei -80 °C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde der Inhalt aller drei Flaschen vereinigt und bei 9.200 g für 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde verworfen und der ÜS bei 23.000 g für 90 min erneut zentrifugiert. Das virionenhaltige Pellet wurde in 10 ml ddH₂O inkl. 0,2 % FKS aufgenommen, mit je 100 µl DNase (100 µg/ml) und RNase (100 µg/ml) versetzt und 15 min bei 37 °C inkubiert. Dieser Schritt diente dem Verdau zellulärer DNS und RNS, während die virale DNS durch das Kapsid geschützt blieb. Nach Zentrifugation der Viruspartikel bei 30.000 g für 90 min

wurde das Viruspellet zunächst in 2,7 ml TE9 aufgenommen und zum Aufschluss der Kapside mit 300 µl Proteinase K (0,8 mg/ml) in 10 % SDS versetzt und üN bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Am nächsten Tag wurden 3 ml PC9 zugegeben, die wässrige und die organische Phase durch vortexen gemischt und in *Phase-Lock Tubes Heavy* überführt. Diese enthielten ein Gel, welches sich während der Phasentrennung durch Zentrifugation für 5 min bei 3.000 g zwischen die Phenol/Chloroform-haltige organische Phase und die DNS-haltige wässrige Phase lagerte. Dadurch wurden die in Folgeanwendungen störenden organischen Rückstände reduziert. Das Volumen der abgenommenen wässrigen Phase wurde bestimmt und zur Fällung der DNS mit 0,1 Volumen an 3 M Natriumacetat und 2,5 Volumen auf -20 °C vorgekühltem 96 % Ethanol gemischt. Das durch Zentrifugation bei 15.000g und 4 °C für 30 min gewonnene DNS-Pellet wurde in 150 µl H₂O_{PCR-GRADE} aufgenommen und die Konzentration wie unter 3.2.7 beschrieben bestimmt.

3.4 Tierexperimentelle Methoden

Sämtliche tierexperimentellen Arbeiten wurden im hauseigenen Tierstall durchgeführt. Die Pflege und Haltung der Tiere wurde von ausgebildetem Personal übernommen. Die Tiere wurden in einem 12-Stunden-Tag/Nachtwechsel gehalten. Um eine stressbedingte Beeinflussung der Versuchsergebnisse zu verhindern, wurde vor Beginn der Versuche eine „Ruhewoche“ eingehalten, in der sich die Tiere an die Umgebungsveränderung gewöhnen konnten.

3.4.1 Gruppeneinteilung der Versuchstiere

Für die Studien zur Funktionalität des RCTLs *in vivo* wurden Tiere der Rattenstämme WAG und SD verwendet. Zur Untersuchung wurden folgende Viren verwendet: RCMV-E Wildtypvirus (RCMV-E wt), RCTL-Deletionsvirus (RCMV-E ΔRCTL) und RCTL-Revertante (RCMV-E REV). Je Virus wurden zwei Untergruppen gebildet, von denen eine am Tag vor der Infektion mit NK-Zell-depletierenden Antikörpern behandelt wurde, während die zweite Gruppe vor der Infektion keine Injektion erhielt. Als Kontrolle (mock) diente je Rattenstamm eine Gruppe von Tieren die weder Antikörper noch Virus erhielten (siehe Tabelle 27). Jede Untersuchungsgruppe, bestehend aus fünf Tieren, wurde während der gesamten Versuchsdauer gemeinsam in einem Käfig gehalten.

Tabelle 27: Einteilung der Tiere in Versuchsgruppen

Gruppe	Rattenstamm	Virus	NK-Zell-Depletion	Gruppe	Rattenstamm	Virus	NK-Zell-Depletion
1	WAG	RCMV-E wt	-	8	SD	RCMV-E wt	-
2	WAG	RCMV-E Δ RCTL	-	9	SD	RCMV-E Δ RCTL	-
3	WAG	RCMV-E REV	-	10	SD	RCMV-E REV	-
4	WAG	RCMV-E wt	Ja	11	SD	RCMV-E wt	Ja
5	WAG	RCMV-E Δ RCTL	Ja	12	SD	RCMV-E Δ RCTL	Ja
6	WAG	RCMV-E REV	Ja	13	SD	RCMV-E REV	Ja
7	WAG	mock	-	14	SD	mock	-

3.4.2 Antikörperapplikation und Infektion der Tiere

Einen Tag vor der Infektion wurden den Tieren 500 μ l einer Antikörpermischung aus Anti Asialo GM1 (genaue Konzentration vom Hersteller nicht mitgeteilt) und 3.2.3 (500 μ g/ml), verdünnt in H_2O_{injekt} in die Schwanzvene injiziert. Zur Infektion wurden je Tier 1×10^7 Viren in 1 ml PBS verdünnt und intraperitoneal injiziert. Während der weiteren Studie wurden weder die Haltungsbedingungen noch die Gruppenzusammenstellung verändert.

3.4.3 Tötung und Organentnahme

Am dritten Tag nach der Infektion wurden die Tiere durch eine letale Inhalationsnarkose mit Isofluran getötet. Anschließend wurden sowohl die Milz als auch die Leber entnommen. Für die DNS-Präparation wurden von jedem Organ 20 mg direkt in den Lysispuffer des *DNeasy[®] Blood and Tissue Kits* gegeben. Der Rest der Milz und 1 g Leber wurden auf Eis gelagert und direkt im Anschluss die Viruslast durch Titration bestimmt.

3.4.4 Herstellung von Organhomogenisaten und Titration der Organe

Vor der Titration wurden die Milz- und Leberproben jeweils mit 1 ml DMEM 2 % FKS mittels eines Spritzenstempels durch ein 70 μ m Nylonsieb gerieben, um Bindegewebe zu entfernen. Die so erhaltenen Homogenisate wurden zum Zellaufschluss in 5 ml Organhomogenisatoren weiter verarbeitet und wie unter 3.3.7 beschrieben in den Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-6} auf REF-Zellen titriert.

3.5 Computergestützte Methoden zur Sequenzanalyse

Für die Annotation der offenen Leserahmen (ORF) im RCMV-E Genom wurden die Progammpakete Lasergene 8 und Geneious 5.4 verwendet. Die phylogenetischen Berechnungen wurden mit dem freiverfügbaren Programm MEGA5 durchgeführt (Tamura et al., 2011).

3.5.1 Identifizierung und Nomenklatur der offenen Leserahmen (ORF) im RCMV-England Genom

In der automatisierten Suche nach potenziellen Leserahmen wurden nur solche zugelassen, die mit einem ATG als Startcodon begannen, für mindestens 100 Aminosäuren kodierten und mit keinem benachbarten ORF zu mehr als 60 % überlappten. Die Nukleotidsequenzen wurden mittels der nicht-redundanten NCBI-Blast-Datenbank und des Analyse-Algorithmus *Blastx* auf mögliche Homologe untersucht. *BlastX* translatiert sowohl die Leserahmen der eingegebenen als auch des komplementären Strangs und sucht in der Protein-Datenbank nach homologen Proteinen. Als Einschlusskriterium wurde dabei ein prädiktiver Wert (e-value) von $<0,001$ angelegt. Übereinstimmungen mit einer e-value $>0,001$ wurden als Zufallstreffer gewertet und die ORFs zunächst nicht im Genom annotiert. Die identifizierten Leserahmen wurden durch jene ORFs ergänzt, die für das RCMV-E bereits publiziert oder in der Arbeitsgruppe durch Transkriptionsanalysen identifiziert wurden. Die Benennung der ORFs erfolgte nach den üblichen Standards und orientierte sich am MCMV bzw. RCMV-M Genom (Rawlinson et al., 1996; Vink et al., 2000). Sämtlichen ORFs wurde das Präfix „E“, für RCMV-E, vorangestellt. Leserahmen, zu denen Homologe bei HCMV existieren, wurden mit Großbuchstaben (z. B. E23) und jene ohne solche Homologe mit Kleinbuchstaben (z. B. e20) gekennzeichnet. Die Nummerierung wurde analog zu den Homologen in MCMV und RCMV-M vorgenommen. In einigen Fällen (e152, e153 und e155) wurde bei verschiedenen ORFs in der BlastP-Analyse dasselbe Homolog gefunden. In diesen Fällen wurde der Leserahmen mit dem niedrigsten prädiktiven Wert (e-value) nach obigen Kriterien benannt. Die restlichen ORFs wurden mit Unternummern (z. B. 152.1, e152.2) versehen. Für die bereits publizierten ORFs wurde die bereits publizierte Nomenklatur übernommen.

Exons gespleißter Proteine, die bei diesem Verfahren nicht identifiziert werden konnten, wurden durch manuelle Vergleiche mit ihren Homologen im RCMV-M und verschiedenen Isolaten des murinen CMV ermittelt. Die zwischen den identifizierten ORF liegenden Genomabschnitte wurden auf Leserahmen untersucht, die über ein ATG verfügen und für mindestens 20 Aminosäuren kodieren, wurden in einer zweiten Analyse und unter Verwendung derselben Ausschlußkriterien annotiert.

Um der Möglichkeit Rechnung zu tragen, dass im RCMV-E Genom bislang unbekannte Proteine kodiert sind, wurden Leserahmen, die in der ersten Analyse (100 AS, <60 % Überlappung) aufgrund fehlender Homologe ausgeschlossen wurden, als putative Proteine unter der Bezeichnung ORF in die Annotation aufgenommen und fortlaufend nummeriert.

Repetitive Sequenzelemente wurden unter Verwendung des Phobos-Plugins von Geneious ermittelt. Dabei wurden repetitive Nukleinsäurefolgen von mindestens 10 Basen zugelassen, die in der Summe der Wiederholungen eine Minimalgröße von 30 Nukleotiden aufwiesen.

3.5.2 Phylogenetische Analysen

Als Grundlage für die phylogenetische Eingruppierung des RCMV-E wurden die Sequenzen der konservierten Proteine DNS-Polymerase, Glykoprotein B, Terminaseuntereinheit, *single strand binding protein*, *major capsid protein*, Terminase und DNS-Helicase ausgewählt und sowohl Einzelstammbäume als auch ein Gesamtstammbaum erstellt. Für Letzteren wurden die Sequenzen der Einzelproteine zu einem artifiziellen Fusionsprotein zusammengefügt und den gleichen Berechnungsmodellen unterzogen.

Die Sequenzvergleiche wurden unter Verwendung des Programms Geneious mit dem ClustalW-Algorithmus und der BLOSUM-Substitutionsmatrix erstellt. Anhand dieser Sequenzvergleiche wurden mittels der Software MEGA5 *maximum likelihood*-Stammbäume basierend auf dem Jones-Taylor-Thornton-Modell (JTT) erstellt. Als Zusatzparameter dienten die Häufigkeit der Aminosäuren in der Sequenz (+F), die Annahme der gleichen Mutationshäufigkeit in jeder Sequenz (+G) und eine geschätzte Anzahl invarianter Aminosäuren (+I). Lücken in den Sequenzvergleichen wurden von der Analyse ausgeschlossen und zur statistischen Absicherung bei vertretbarem Rechenaufwand eine Bootstrap-Analyse mit 1.000 Wiederholungen angeschlossen.

Die Bezeichnungen der Proteine nebst der dazugehörigen Datenbankeinträge (Acc.-No.) der in die Analyse einbezogenen Viren sind der nachgestellten Tabelle 28 zu entnehmen. Sind keine Acc.-No unter den Bezeichnungen angegeben, waren diese nicht in GenBank hinterlegt und wurden aus der Virusreferenzsequenz ermittelt.

Tabelle 28: Zusammenstellung der für die phylogenetische Eingruppierung verwendeten Viren und Proteine inklusive der GenBank Acc.-No.

Virus	DNS-Polymerase	Glykoprotein B	Terminase Untereinheit	Single strand DNS binding protein	Major capsid protein	Terminase	DNS-Helicase
RCMV-E	E54	E55	E56	E57	e86	E89	e105
RCMV-M AF232689	R54 AAF99153	R55 AAC56432	R56 AAC56431	R57 AAC56430	R86 AAF99174	R89 Ex1: AAF99183 Ex2: AAF99177	R105 AAF99194
MCMV Smith NC_004065	M54* AAA45940	M55 YP_214067	M56 YP_214068	M57* CAA47414	M86	M89 Ex1 YP_214090	M105 YP_214105
MCMV (G4) EU579859	M54 ACE95241	M55 ACE95242	M56 ACE95243	M57 ACE95244	M86 ACE95263	M89 ACE95266	M105 ACE95281
MCMV (WP15B) EU579860	M54 ACE95404	M55 ACE95405	M56 ACE95406	M57 ACE95407	M86 ACE95427	M89 ACE95430	M105 ACE95445
MCMV (K181) AM886412	M54 CAP08103	M55 CAP08104	M56 CAP08105	M57 CAP08106	M86 CAP08126	M89 Ex1: AM237572 Ex2: CAJ87074	M105 CAP08143
MCMV (C4A) EU579861	M54 ACE95568	M55 ACE95569	M56 ACE95570	M57 ACE95571	M86 ACE95591	M89 ACE95594	M105 ACE95609
GPCMV FJ355434	GP54 AAA43831	GP55 AAA43832	GP56 ACJ35835	GP57 ACJ35836	GP86 ACJ35854	GP89 ACJ35861	GP105 ACJ35870
HCMV AD169 X17403	HCMVUL54 CAA35413	HCMVUL55 CAA35414	HCMVUL56 CAA35371	HCMVUL57 CAA35372	HCMVUL86 CAA35360	HCMVUL89 CAA35363	HCMVUL105 CAA35340
HCMV Merlin AY446894	UL54 AAR31619	UL55 AAR31620	UL56 AAR31621	UL57 AAR31622	UL86 AAR31638	UL89 AAR31641	UL105 AAR31655
CCMV AF480884	UL54 AAM00704	UL55 AAM00705	UL56 AAM00706	UL57 AAM00707	UL86 AAM00725	UL89 AAM00728	L105 AAM00742
RhCMV AY186194	rh87 AAP50613	rh89 AAP50615	rh91 AAP50617	rh92 AAP50618	rh118 AAP50644	Rh UL89 AAZ80628	rh142 AAP50666

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung zur Genomstruktur des RCMV-England

Bis heute sind bereits verschiedene CMV-Isolate aus *Rattus norvegicus* und *Rattus rattus* isoliert worden (Bruggeman et al., 1982; Priscott & Tyrrell, 1982; Smith et al., 2004). Die beiden am besten untersuchten RCMVs sind die 1982 in Maastricht und England gewonnenen Isolate RCMV-M (Bruggeman et al., 1982) und RCMV-E (Priscott & Tyrrell, 1982). RCMV-M wurde 2000 vollständig sequenziert und als *Murid Herpesvirus 2* im Genus *Muromegalovirus* klassifiziert (Bruggeman et al., 1982; Vink et al., 2000). RCMV-E wurde bislang nur in Teilen sequenziert und publiziert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Sequenz des RCMV-E Gesamtgenoms untersucht und mit den Genomen von MCMV (Smith) und RCMV-M verglichen.

Das RCMV-E Genom hat eine Gesamtlänge von 202.953 Basenpaaren und ist somit ca. 3 kBp kleiner, als durch Restriktionsanalysen angenommen wurde (Burns et al., 1988). Vergleichbare CMV-Genome wie die von MCMV, RCMV-M und HCMV sind ca. 30 kBp größer. Der G+C-Gehalt von 40,3 % ist deutlich niedriger als bei anderen CMVs, bei denen er zwischen 54,9 % (GPCMV) und 68,2 % (RCMV-M) liegt. An den Enden des Genoms steigt der G+C-Gehalt deutlich auf 50 % bis 60 % an (siehe Abbildung 4). Ein Abschnitt reduzierten G+C-Gehalts, wie er für MCMV beschrieben ist, wurde nicht gefunden (Rawlinson et al., 1996). Anhand der Sequenzinformation und der genauen Bestimmung der Genomenden (Daten nicht gezeigt) wurde die publizierte Restriktionskarte (Burns et al., 1988) aktualisiert. Durch diese Aktualisierung wurde das zuvor nicht bekannte *HindIII* Fragment Z mit 151 Bp am Ende des Genoms ergänzt (siehe Abbildung 4) und die vorgeschlagene Orientierung des Genoms wurde invertiert, sodass die Anordnung der offenen Leserahmen (ORF) mit der Anordnung bereits publizierter CMV-Genome übereinstimmt.

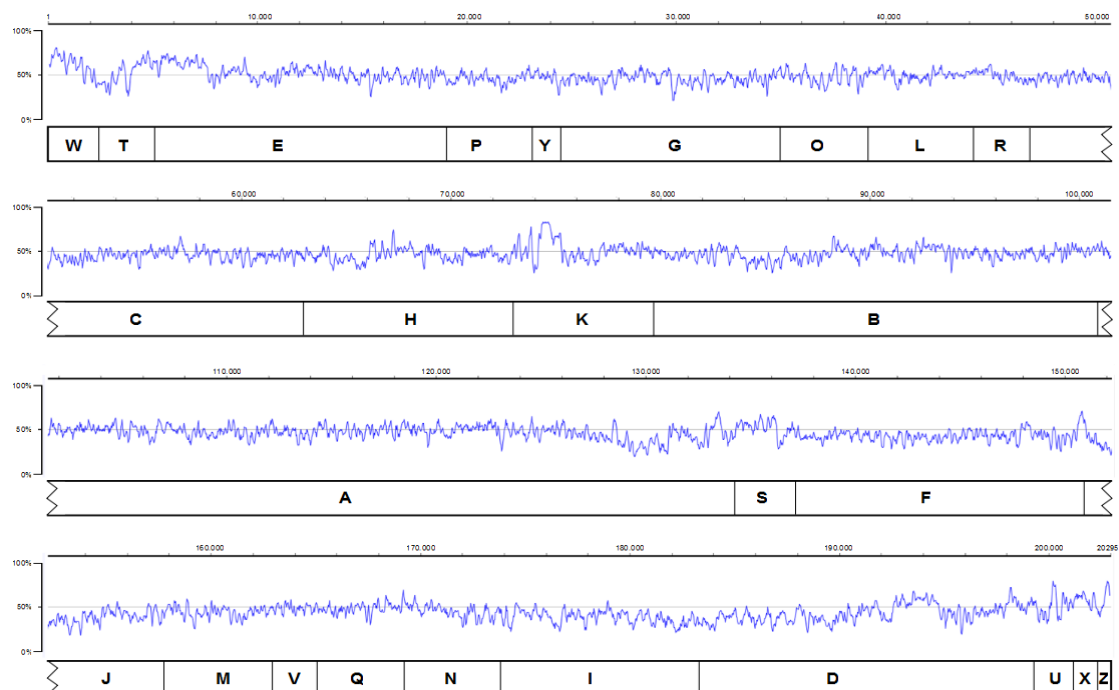


Abbildung 4: G+C-Gehalt und *Hind*III-Restriktionskarte des gesamten RCMV-E Genoms

Der lokale G+C-Gehalt wurde anhand von Fragmenten mit einer Länge von 100 Bp mit dem Programm Geneious ermittelt und als Diagramm ausgegeben. Die Skalierung oberhalb des Graphen ist in 2.000 Bp Hilfs- und 10.000 Bp Hauptintervalle unterteilt. Darunter befindet sich die *Hind*III-Restriktionskarte in Anlehnung an Burns et al. (W H Burns et al., 1988).

RCMV-E verfügt über sieben interne direkte Sequenzwiederholungen (*direct repeats*) DR1 bis DR7 und eine gegenläufige Sequenzwiederholung (*inverted repeat*) IR1 (siehe Tabelle 29), jedoch konnten keine Sequenzwiederholungen an den Genomenden (*terminal repeats*) wie bei MCMV und RCMV-M gefunden werden. Mit Ausnahme von DR7 gruppieren sich diese repetitiven Elemente in den intergenischen Abschnitten zwischen 72,5 kBp und 75,0 kBp bzw. 133,0 kBp und 134,0 kBp. DR7 ist am Ende des Genoms im Bereich zwischen 199.549 und 199.598 lokalisiert (siehe Tabelle 29).

Tabelle 29: Zusammenstellung der repetitiven Elemente

Die unterstrichenen Basen bei DR3 sind zu Beginn und am Ende des Elements identisch und überlappen.

Name	Typ	Sequenz	Länge/Bp	Position Start..Ende	Wiederholungen
DR1	Direct repeat	AAGCACGATGAAACGACAAACCCCGTGAGAAAATGCT AGGTATAACGAAACAAACCCATTAAATGCATTCATACA TGTCGCTTTATTCTCCGATCATCACATACACCTGTCCG CTACCAATCCGAGGTTTGAACACCGTTTCGTATACC GTGCCGATTTACGTTTGCCGGGTACGGTGTTTTCGT TAATAACCCACATTTACCGCTATCCTATCGATGATCC CAACGAACGGTCTTCGAGACCGTTTAGCTACACGCC CCGCTCCCCACAAACGACAGCTTATTGGTCGTTATG GGGGTCAACACCTGTCAATCATGCCTGGGTCCGAATG TGCAACAAAGCAATAAGGTAGATACAAATCACGTGAT GTGAAAAGTTTGAATCTCCCGGTGGCAGAGCAACG CAATGAGGGCGGTGGCATAAGGCGGGTGCATTGTGA TGTGGGCGTGGATGTGGGAGGGGCGGGGAGGGCTG CACGTGGGCGCGCATATGGGCGGGACGTGCGCGTG CACAAAAGGGTCGCGCGCGTGTGC	541	72.608..73.689	2
DR2	Direct repeat	CTCGGCTCCCCCGGCTC	17	74.189..74.528	20
DR3	Direct repeat	<u>TCCCCCGGCCCTTTCCCGGCCCTCGGTTCCCCCGG</u>	32	74.535..74.598	2
DR4	Direct repeat	CCCGGTCCCTTT	12	74.793..75.033	20
DR5	Direct repeat	GTTCCCCGGTCCC	13	75.062..75.100	3
DR6	Direct repeat	CGGTCTCCGTCTCGGAG	17	133.259..133.360	6
IR1	Inverted repeat	TTTTTTCGTCGACACAT	17	133.809..133.825 133.851..133.835	2
DR7	Direct repeat	CAAAAATACA	10	199.549..199.598	5

4.1.1 Datenbankgestützte Identifizierung der offenen Leserahmen im RCMV-E Genom

Wie unter 3.5.1 beschrieben, wurde die Bestimmung der offenen Leserahmen in verschiedenen Schritten durchgeführt. In der ersten Analyse wurden lediglich ORFs annotiert, die über ein ATG als Start-Codon verfügten, eine minimale Länge von 300 Nukleotiden aufwiesen und mit keinem benachbarten ORF zu mehr als 60 % überlappten. Diese Analyse ergab 220 putative Leserahmen in wechselseitiger Orientierung. In einer BlastX-Analyse wurden diese ORFs mit der nicht redundanten Protein-Datenbank des *National Centers for Biotechnology Information* (NCBI) verglichen und nach homologen Proteinen gesucht. Für 114 RCMV-E ORFs konnten homologe Proteine in MCMV bzw. RCMV-M identifiziert werden. Einzig der Leserahmen e127 wies keine Sequenzidentität zu einem in der Datenbank hinterlegten CMV-Protein auf. Bei dem Homolog mit der höchsten Sequenzidentität handelte es sich um OX2 (CD200; Acc.-No: NP_113706) von *Rattus norvegicus*. Für die verbleibenden RCMV-E 105 ORFs konnten entweder keine Proteine ähnlicher Sequenz gefunden werden oder aber der prädiktive Wert für eine zufällige Ähnlichkeit (e-value) lag oberhalb der angesetzten Grenze von

0,001. Diese Leserahmen wurden folglich nicht im Genom annotiert. Die Expression der Leserahmen RCTL sowie eines weiteren bisher noch unveröffentlichten Gens (RCTL2) und ORF8 wurden durch RACE-Analysen bereits bestätigt und in die erste Annotation aufgenommen (Eckhardt, 2007; Friedrich, 2007; Voigt et al., 2001).

Nach der Annotation der ersten 118 RCMV-E ORF wurden die dazwischen liegenden intergenischen Bereiche in einer Detailanalyse untersucht. Es wurden dieselben Kriterien wie in der ersten Suche angelegt, lediglich die Mindestlänge der ORFs wurde auf 60 Nukleotide reduziert. Von den 325 in dieser Suche identifizierten putativen Leserahmen wiesen nur E91 und e124 eine signifikante Sequenzidentität zu den in der Datenbank hinterlegten Proteinen auf und wurden annotiert. Im Falle einer ergebnislosen Datenbankabfrage wurden diese kleinen ORF nicht im Genom annotiert.

Jedes Cytomegalovirus kodiert für Gene, die in keinem anderen CMV zu finden sind. Um dieser Möglichkeit Rechnung zu tragen, wurden Leserahmen, die in der ersten Analyse aufgrund fehlender Homologe ausgeschlossen wurden, als putative Leserahmen unter der Bezeichnung ORF in die Annotation aufgenommen und fortlaufend nummeriert. Insgesamt wurden 19 Leserahmen (ORF1 - ORF19) ergänzt, zu denen keine klaren Homologe in der NCBI-Datenbank identifiziert werden konnten. Eine Auflistung sämtlicher im Genom annotierten Gene inklusive des Homologs mit der größten Sequenzidentität in der BlastX-Analyse ist in Tabelle 30 gezeigt.

Tabelle 30: Zusammenfassung der ORF Analysen mittels BlastX

^a Leserahmen zu denen Homologe in HCMV bekannt sind, sind durch das Präfix „E“ und solche ohne HCMV-Homologe durch „e“ gekennzeichnet. Die Suffixe ex1, ex2 bis ex5 kennzeichnen die Exons gespleißter Gene und wurden nicht einzeln analysiert.

^b Auf dem komplementären Strang kodierte ORF sind durch ein C markiert, ORF auf dem Code-Strang erhielten keine besondere Kennzeichnung.

^c Start und Ende geben lediglich die erste und letzte Base des ORF an, ohne die Orientierung des Leserahmens zu berücksichtigen.

^d Die Namen der in der Datenbank gefundenen Homologe wurde der gängigen Nomenklatur angepasst. Die Virus- und Subspezies sind in Klammern angegeben.

^e Alternative Homologe und Acc.-No. zu bereits in GenBank hinterlegten Sequenzen von RCMV-E.

ORF ^a	Strang ^b	Position ^c		Länge (Nt)	BlastX (110529)			
		Start	Ende		höchste Übereinstimmung ^d	Acc.-No.	Referenz	Kommentar ^e
ORF 1	C	412	792	381				
RCTL ex1		1057	1541	485				
RCTL ex2		2214	2333	120				
RCTL		2214	2990	777				
RCTL ex3		2410	2589	180				
RCTL ex4		2665	2771	107				
RCTL ex5		2855	2990	136				
ORF 2		3005	3304	300				
ORF 3	C	3783	7463	3681				
e20	C	7871	10177	2307	m20 [MCMV (C4A)]	ACE95529	(Smith et al., 2008)	

ORF ^a	Strang ^b	Position ^c		Länge (Nt)	BlastX (110529)			Kommentar ^d
		Start	Ende		höchste Übereinstimmung ^d	Acc.-No.	Referenz	
E23	C	10700	11872	1173	M23 [MCMV (Smith)]	YP_214031	(Rawlinson et al., 1996)	
E24	C	12003	12968	966	m24 protein [MCMV (K181)]	CAP08068	(Redwood et al., 2005)	
E25	C	13119	15215	2097	M25 [MCMV (W15B)]	ACE95370	(Smith et al., 2008)	
e25.1	C	15326	16690	1365	m25.1 [MCMV (Smith)]	YP_214035	(Rawlinson et al., 1996)	
e25.2	C	16327	17283	957	m25.2 [MCMV (G4)]	ACE95209	(Smith et al., 2008)	
E26	C	17273	18013	741	M26 [MCMV (G4)]	ACE95210	(Smith et al., 2008)	
E27	C	18108	20078	1971	M27 [MCMV (G4)]	ACE95211	(Smith et al., 2008)	
E28	C	20258	21406	1149	M28 [MCMV (Smith)]	YP_214041	(Rawlinson et al., 1996)	
e29.1	C	21605	22015	411	m29.1 [MCMV (C4A)]	ACE95541	(Smith et al., 2008)	
E31	C	22223	24217	1995	pR31 [RCMV-M]	NP_064136	(Vink et al., 2000)	
E32	C	24253	26103	1851	M32 [MCMV (K181)]	CAP08078	(Redwood et al., 2005)	
E33 ex1		26188	26220	33				
E33		26188	27604	1417	M33 [MCMV (Smith)]	Q83207	(Davis-Poynter et al., 1997)	
E33 ex2		26303	27604	1302				
E34		27832	29652	1821	M34 [MCMV (Smith)]	YP_214047	(Rawlinson et al., 1996)	
E35		29809	31326	1518	pR35 [RCMV-M]	NP_064140	(Vink et al., 2000)	
E36 ex2	C	31375	32615	1241				
E36	C	31375	32876	1502	M36 [MCMV (G4)]	ACE95221	(Smith et al., 2008)	
E36 ex1	C	32693	32876	184				
E37	C	33025	33990	966	M37 [MCMV (Smith)]	YP_214049	(Rawlinson et al., 1996)	
E38	C	34383	35924	1542	M38 [MCMV (W15B)]	ACE95386	(Smith et al., 2008)	
e38.5	C	35788	36222	435	M38.5 [MCMV (C4A)]	ACE95551	(Smith et al., 2008)	ABZ01583
e39	C	36313	36825	513	pr39 [RCMV-M]	NP_064144	(Vink et al., 2000)	
e40	C	37147	37518	372	m40 [MCMV (G4)]	ACE95226	(Smith et al., 2008)	
e41	C	37647	38030	384	m41 [MCMV (W15B)]	ACE95390	(Smith et al., 2008)	
e41.1	C	37856	38023	168	r41.1 [RCMV-M]	ACQ65681	(Cam et al., 2010)	
e42	C	38096	38461	366	pr42 [RCMV-M]	NP_064147	(Vink et al., 2000)	
E43	C	38765	40246	1482	M43 [MCMV (C4A)]	ACE95556	(Smith et al., 2008)	
E44	C	40560	41720	1161	M44 [MCMV (Smith)]	CAJ84738	(Smith et al., 2006)	
E45	C	42018	45059	3042	pR45 [RCMV-M]	NP_064151	(Vink et al., 2000)	
E46	C	45059	45943	885	M46 [MCMV (Smith)]	YP_214059	(Rawlinson et al., 1996)	
E47		45942	48818	2877	pR47 [RCMV-M]	NP_064153	(Vink et al., 2000)	
E48		48906	54995	6090	M48 [MCMV (C4A)]	ACE95561	(Smith et al., 2008)	
e48.2	C	55015	55254	240	M48.2 [MCMV (Smith)]	YP_214061	(Rawlinson et al., 1996)	
E49	C	55247	56737	1491	M49 [MCMV (C4A)]	ACE95563	(Smith et al., 2008)	
E50	C	56709	57521	813	M50 [MCMV (W15B)]	ACE95400	(Smith et al., 2008)	
E51	C	57581	57907	327	M51 [MCMV (G4)]	ACE95238	(Smith et al., 2008)	
E52		57937	59457	1521	M52 [MCMV (G4)]	ACE95239	(Smith et al., 2008)	
E53		59450	60292	843	M53 [MCMV (W15B)]	ACE95403	(Smith et al., 2008)	
E54	C	60334	63456	3123	M54 [MCMV (G4)]	ACE95241	(Smith et al., 2008)	ADB44898
E55	C	63480	66119	2640	M55 [MCMV (C4A)]	ACE95569	(Smith et al., 2008)	ADB44899
E56	C	66067	68388	2322	M56 [MCMV (W15B)]	ACE95405	(Smith et al., 2008)	
E57	C	68606	72094	3489	M57 [MCMV (W15B)]	ACE95407	(Smith et al., 2008)	
ORF 4		72121	72594	474				
E69	C	76901	78814	1914	M69 [MCMV (G4)]	ACE95246	(Smith et al., 2008)	
E70	C	79021	81672	2652	M70 [MCMV (G4)]	ACE95247	(Smith et al., 2008)	
E71		81671	82399	729	M71 [MCMV (Smith)]	YP_214074	(Rawlinson et al., 1996)	
E72	C	82448	83473	1026	pR72 [RCMV-M]	NP_064172	(Vink et al., 2000)	
e73.5 ex1		83472	83536	65				
e73.5		83472	85121	1650	m73.5 [MCMV (W15B)]	ACE95414	(Smith et al., 2008)	
E73		83472	83837	366	pR73 [RCMV-M]	NP_064173	(Vink et al., 2000)	
e74	C	83814	84899	1086	m74 [MCMV (W15B)]	ACE95415	(Smith et al., 2008)	
e73.5 ex2		84953	85121	169				
E75	C	85193	87343	2151	M75 [MCMV (C4A)]	ACE95580	(Smith et al., 2008)	
E76		87440	88195	756	M76 [MCMV (C4A)]	ACE95581	(Smith et al., 2008)	
E77		87984	89726	1743	M77 [MCMV (Smith)]	YP_214080	(Rawlinson et al., 1996)	
E78		89886	91199	1314	M78 [MCMV (W15B)]	ACE95419	(Smith et al., 2008)	
E79	C	91247	92023	777	M79 [MCMV (K181)]	CAP08119	(Redwood et al., 2005)	
E80		92022	93707	1686	M80 [MCMV (C4A)]	ACE95585	(Smith et al., 2008)	
E82	C	93740	95446	1707	pR82 [RCMV-M]	NP_064181	(Vink et al., 2000)	
E83	C	95519	97288	1770	pR83 [RCMV-M]	NP_064182	(C Vink et al., 2000)	
E84	C	97285	98940	1656	M84 [MCMV (K181)]	CAJ86584	(Redwood et al., 2005)	
E85	C	99095	99997	903	M85 [MCMV (Smith)]	YP_214087	(Rawlinson et al., 1996)	
E86	C	100063	104106	4044	M86 [MCMV (C4A)]	ACE95591	(Smith et al., 2008)	
E87		104155	106635	2481	pR87 [RCMV-M]	NP_064186	(Smith et al., 2008)	
E88		106651	107889	1239	M88 [MCMV (Smith)]	YP_214089	(Rawlinson et al., 1996)	
E89 ex2	C	107886	109011	1126				
E89	C	107886	114214	6329	M89 [MCMV (G4)]	ACE95266	(Smith et al., 2008)	
e90	C	109048	109854	807	m90 [MCMV (Smith)]	YP_214090	(Rawlinson et al., 1996)	
E91		109844	110125	282	M91 [MCMV (Smith)]	YP_214091	(Rawlinson et al., 1996)	
E92		110125	110811	687	M92 [MCMV (Smith)]	YP_214092	(Rawlinson et al., 1996)	
E93		110783	112312	1530	M93 [MCMV (Smith)]	YP_214093	(Rawlinson et al., 1996)	
E94		112245	113267	1023	M94 [MCMV (Smith)]	YP_214094	(Rawlinson et al., 1996)	
E89 ex1	C	113327	114214	888				
E95		114213	115367	1155	M95 [MCMV (W15B)]	ACE95436	(Smith et al., 2008)	
E96		115370	115741	372	M96 [MCMV (Smith)]	YP_214097	(Rawlinson et al., 1996)	
E97		115912	117621	1710	M97 [MCMV (G4)]	ACE95274	(Smith et al., 2008)	
E98		117621	119219	1599	M98 [MCMV (C4A)]	ACE95603	(Smith et al., 2008)	
E99		119156	119446	291	pR99 [RCMV-M]	NP_064200	(Vink et al., 2000)	
E100	C	119543	120598	1056	M100 [MCMV (Smith)]	YP_214101	(Rawlinson et al., 1996)	
E102		120764	122950	2187	M102 [MCMV (Smith)]	YP_214102	(Rawlinson et al., 1996)	

ORF ^a	Strang ^b	Position ^c		Länge (Nt)	BlastX (110529)			Kommentar ^e
		Start	Ende		höchste Übereinstimmung ^d	Acc.-No.	Referenz	
E103	C	123001	123789	789	M103 [MCMV (C4A)]	ACE95607	(Smith et al., 2008)	
E104	C	123767	125794	2028	M104 [MCMV (C4A)]	ACE95608	(Smith et al., 2008)	
E105		125595	128234	2640	M105 [MCMV (W15B)]	ACE95445	(Smith et al., 2008)	
ORF 5	C	133090	133425	336				
E112 ex1		134163	134909	747				
E112		134163	135547	1385	M112 [MCMV (W15B)]	ACE95448	(Smith et al., 2008)	
E113		135012	136118	1107	pR113 [RCMV-M]	NP_064215	(Vink et al., 2000)	M113
E112 ex2		135012	135176	165				
E112 ex3		135527	135547	21				
E114	C	136353	137105	753	M114 [MCMV (Smith)]	YP_214109	(Rawlinson et al., 1996)	
E115	C	137125	137925	801	M115 [MCMV (C4A)]	ACE95614	(Smith et al., 2008)	
E116	C	137922	139247	1326	M116 [MCMV (W15B)]	ACE95451	(Smith et al., 2008)	
e117	C	139314	140543	1230	m117 [MCMV (C4A)]	ACE95616	(Smith et al., 2008)	
E118 ex2	C	140599	141177	579				
E118	C	140599	141429	831	M118 [MCMV (Smith)]	YP_214114	(Rawlinson et al., 1996)	
E118 ex1	C	141214	141429	216				
e119.1	C	141599	142228	630	pr119.1 [RCMV-M]	NP_064221	(Vink et al., 2000)	
e119.2	C	142380	142700	321	pr119.2 [RCMV-M]	NP_064222	(Vink et al., 2000)	
ORF 6	C	143207	143443	237				m119.4 (YP_214119)
e120.1	C	143468	144418	951	m120.1 [MCMV (G4)]	ACE95297	(Smith et al., 2008)	pr119.5; pr119.6
E121	C	144436	146172	1737				
IE2	C	146229	149598	3370	IE3 [MCMV (Smith)]	AAA45948	(Messerle et al., 1992)	AAB92266
IE ex5	C	146229	147490	1262				
IE1	C	147713	149598	1886	m123 [MCMV (G4)]	ACE95346	(Smith et al., 2008)	
IE ex4	C	147713	149112	1400				
IE ex3	C	149198	149388	191				
IE ex2	C	149489	149598	110				
e124		149849	150094	246	m124 [MCMV (C4A)]	ACE95627	(Smith et al., 2008)	
IE ex1	C	150396	150791	396				
e127		153650	154504	855	OX-2 [Rattus norvegicus]	NP_113706	(Foster-Cuevas et al., 2011; Voigt et al., 2005)	AAO45420
e128		154793	156031	1239	M128 [MCMV (Smith)]	YP_214129	(Rawlinson et al., 1996)	
ECK ex2	C	156042	156735	694				
ECK	C	156042	157042	1001	mck-2 [MCMV (W15B)]	ACE95468	(Smith et al., 2008)	AAO45423
ECK ex1	C	156819	157042	224				
e133 ex2	C	157356	157379	24				
e133/sgg1	C	157356	158503	1148	pr133 [RCMV-M]	NP_064241	(Vink et al., 2000)	AAO45422
e133 ex1	C	157640	158503	864				
e135	C	158578	158958	381				
e136	C	159058	159648	591	m136 [MCMV (K181)]	CAP08172	(Redwood et al., 2005)	AAO45425
e137	C	159814	160800	987	pr137 [RCMV-M]	NP_214137	(Vink et al., 2000)	AAO45424
e138	C	160831	162402	1572	pr138 [RCMV-M]	NP_064245	(Vink et al., 2000)	AAO45426
e139	C	162510	164408	1899	m139 [MCMV (W15B)]	ACE95477	(Smith et al., 2008)	CAI64044
e140	C	164413	165804	1392	m140 [MCMV (Smith)]	YP_214140	(Rawlinson et al., 1996)	CAI64045
e141	C	165902	167365	1464	m141 [MCMV (K181)]	CAP08177	(Redwood et al., 2005)	CAI64046
e142	C	167523	168860	1338	m142 [MCMV (Smith)]	YP_214142	(Rawlinson et al., 1996)	CAI64047
e143	C	168975	170555	1581	m143 [MCMV (C4A)]	ACE95644	(Smith et al., 2008)	CAI64048
e144	C	170695	171843	1149	m144 [MCMV (K17A)]	CAJ84748	(Smith et al., 2006)	CAI64049
e149	C	172626	173741	1116	pr149 [RCMV-M]	NP_064256	(Vink et al., 2000)	
e152	C	174227	175399	1173	m152 [MCMV (Smith)]	YP_214152	(Rawlinson et al., 1996)	
e153.1	C	176425	177525	1101	m153 [MCMV (G4)]	ACE95326	(Smith et al., 2008)	
e153	C	177814	179031	1218	m153 [MCMV (C4A)]	ACE95654	(Smith et al., 2008)	
ORF 7	C	179267	180376	1110				
e152.1	C	180908	181996	1089	m152 [MCMV (W15B)]	ACE95490	(Smith et al., 2008)	
e152.2	C	182348	183646	1299	m152 [MCMV (Wirral)]	AAR11191	(Stewart, J.P. 2003)	r152.2
e155	C	183967	184911	945	pr155 [RCMV-M]	NP_064268	(Vink et al., 2000)	pr155
e155.1	C	185048	186121	1074	m155 protein [MCMV (G3e)]	CAJ84756	(Smith et al., 2006)	m155
ORF 8	C	186268	186615	348				
e159	C	186836	188194	1359	m159 [MCMV (C4A)]	ACE95661	(Smith et al., 2008)	
e160	C	188323	189126	804	pr160 [RCMV-M]	NP_064271	(Vink et al., 2000)	
ORF 9	C	189757	190095	339				
ORF 10	C	190149	190547	399				
e164	C	190573	191733	1161	m164 [MCMV (Smith)]	YP_214164	(Rawlinson et al., 1996)	
e166	C	192114	193214	1101	pr166 [RCMV-M]	NP_064275	(Vink et al., 2000)	
e167	C	193351	194634	1284	m167 [MCMV (G4)]	ACE95342	(Smith et al., 2008)	
RCTL2	C	195033	195854	822				
RCTL2 ex4	C	195033	195156	124				
RCTL2 ex3	C	195253	195353	101				
RCTL2 ex2	C	195426	195622	197				
RCTL2 ex1	C	195728	195854	127				
ORF 11		196237	196980	744				
ORF 12		197065	197610	546				
ORF 13		197792	198430	639				
ORF 14	C	198641	199003	363				
ORF 15		198894	199340	447				
ORF 16	C	199454	199654	201				HhVBgp007 (NP_050182)
ORF 17	C	200237	200572	336				
ORF 18	C	201034	201384	351				
ORF 19	C	201428	201901	474				

Gespleißte Gene in RCMV-E

Gespleißte Gene sind in allen Herpesviren zu finden. Inklusive der verschiedenen Varianten der IE-Proteine wurden zwölf gespleißte Gene im RCMV-E Genom gefunden (siehe Tabelle 31). Bis auf die beiden Leserahmen von RCTL und RCTL2 wurden zu allen von diesen Leserahmen kodierten Proteinen Homologe sowohl in MCMV und RCMV-M gefunden. Zu RCTL wurde bei der Reannotation des RCMV-M Genoms ein Homolog (r153) gefunden (Brocchieri et al., 2005) r153 ist im Gegensatz zu RCTL nicht am Anfang, sondern wie auch RCTL2 am Ende des Genoms lokalisiert. Vergleichende Untersuchungen dieser drei Proteine wurden im Rahmen der strukturellen Analyse von RCTL (siehe 4.2.1) durchgeführt.

Tabelle 31: Übersicht der gespleißten Gene in RCMV-E

Name	Strang	Anzahl der Exons	Position der Exons (Start..Stopp)	Kommentar
RCTL		5	1057..1541 2214..2333 2410..2589 2665..2771 2855..2990	Das Protein wird nur von den Exons 2 - 5 translatiert.
E33		2	26188..26220 26303..27604	
E36	C	2	29809..31326 32693..32876	
e73.5		2	83472..83536 84953..85121	
E89	C	2	107886..109011 113327..114214	
E112		3	134163..134909 135012..135176 135527..135547	
E118	C	2	140599..14177 141214..141429	
IE1	C	4	147713..149112 149198..149388 149489..149598 150396..150791	Der gesamte IE-Lokus besteht aus 5 Exons. Die mRNA von IE1 beinhaltet die Exons 1 - 4 und die von IE2 die Exons 1 - 3 und 5. Bei beiden Proteinen wird Exon 1 nicht translatiert.
IE2	C	4	146229..147490 149198..149388 149489..149598 150396..150791	
ECK	C	2	156042..156735 156819..157042	
e133/sgg1	C	2	156042..156735 157640..158503	
RCTL2	C	4	195033..195156 195253..195353 195426..195622 195728..195854	

Annotation von Leserahmen, die nicht alle Kriterien erfüllen

Die beiden in Abbildung 5 grau dargestellten trunkierten ORFs e113 und e124 verfügen über kein eigenes Start-Codon. Sie wurden dennoch in die Annotation

aufgenommen, da zu beiden Leserahmen Homologe in MCMV und RCMV-M gefunden wurden (Rawlinson et al., 1996; Vink et al., 2000).

Die beiden putativen Leserahmen ORF6 und ORF16 wurden ebenfalls im Genom annotiert. Sie kodieren für weniger als 100 AS und weisen eine nur geringe Sequenzidentität (e-value > 0,001) zu Proteinen aus der NCBI-Datenbank auf. ORF6 ist zwischen den Leserahmen und e119.2 und e120.1 lokalisiert und weist eine geringe Ähnlichkeit zu m119.4 (Acc.-No.: YP214119) auf. Für ORF16 wurde in der BlastX-Analyse das Glykoprotein gp007 (Acc.-No.: NP_050182) des humanen Herpesvirus 6 (HHV6) als mögliches Homolog ermittelt. Der prädiktive Wert lag mit 0,009 ebenfalls außerhalb der Einschlußkriterien. Beide ORFs wurden dennoch im Genom annotiert, da es sich bei beiden vorgeschlagenen Homologen um virale Proteine handelte.

Nach Abschluss der Analysen wurden im RCMV-E Genom insgesamt 139 offene Leserahmen annotiert. 119 der RCMV-E gefundenen ORFs kodieren für Proteine, zu denen Homologe in MCMV oder RCMV-M bekannt sind. Eine maximale Übereinstimmung zu Proteinen von MCMV wurde in 93 Fällen ermittelt, während nur 23 der translatierten RCMV-E ORFs eine maximale Sequenzidentität zu Proteinen in RCMV-M aufwiesen.

Abbildung 5 zeigt eine graphische Darstellung aller im RCMV-E annotierten Leserahmen.

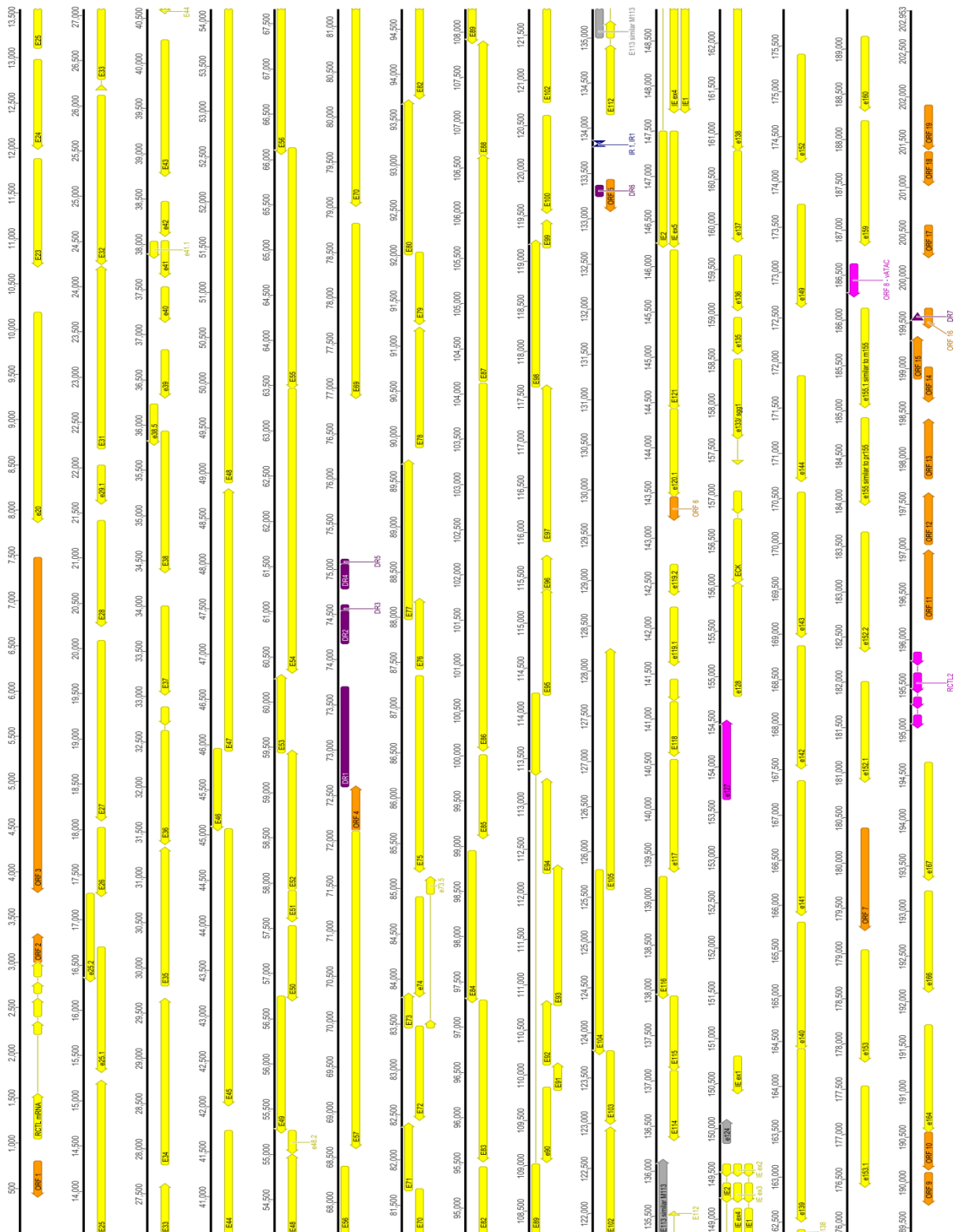


Abbildung 5: Schematische ORF-Karte des RCMV-E-Genoms.

ORFs zu denen Homologe im HCMV-Genom existieren, sind durch Großbuchstaben gekennzeichnet (z. B. E23). Vorangestellte Kleinbuchstaben repräsentieren ORFs, ohne HCMV-Homologe (z. B. e20). ORFs bei denen die BlastX Analyse Homologe in MCMV oder RCMV-M ergab, sind in gelb unterhalb der Skala dargestellt. Ausschließlich in RCMV-E identifizierte ORFs, deren Expression bestätigt wurde (pink) und solche die für putative Proteine kodieren (orange), sind oberhalb der Skala dargestellt. Die grauen ORFs (E113 und e124) markieren trunkierte ORFs deren Startcodons fehlen, zu denen Homologe in anderen CMVs existieren. *Direct repeats* sind lila und *inverted repeats* blau dargestellt. Eine detaillierte Auflistung der ORFs finden sich in Tabelle 30 und Tabelle 32.

4.1.2 Vergleich der RCMV-E ORFs mit den Homologen aus MCMV und RCMV-M

Zu 116 der 139 im RCMV-E Genom annotierten Leserahmen wurden homologe ORFs in RCMV-M und MCMV gefunden. Für den direkten Vergleich der ORFs aller drei Viren wurden die Nukleotid- und Proteinsequenzen der korrespondierenden Leserahmen aus den Genomen von MCMV-Smith (NC_004065) und RCMV-M (AF232689) extrahiert. Die Sequenzvergleiche wurden paarweise unter Verwendung des ClustalW-Algorithmus durchgeführt und die prozentuale Übereinstimmung in Tabelle 32 eingetragen. Die maximale Übereinstimmung ist grau unterlegt. Zur Identifizierung der Unterschiede im Genomaufbau und fehlender Gene wurden Genkarten der drei Viren erstellt und konservierte Genblöcke identifiziert (Abbildung 6).

Tabelle 32: Vergleich der ORFs von RCMV-E, RCMV-M und MCMV Smith

Für die Identitätsuntersuchung wurden die Viren RCMV-M (AF232689) und MCMV Smith (NC_004065) verwendet. Die maximale Sequenzübereinstimmung wurde jeweils grau unterlegt.

ORF	Länge (Nt)	Länge (AS)	MW (kD)	Nukleotid Identität (%)			Protein Identität (%)			Funktion Genfamilie
				RCMV-E		MCMV	RCMV-E		MCMV	
				RCMV-M	MCMV	MCMV	RCMV-M	MCMV	MCMV	
ORF 1	381	127	13,7							
RCTL	777	181	20,8							
ORF 2	300	100	11,2							
ORF 3	3681	1227	124,0							
e20	2307	769	85,2		45,3			26,1		-
E23	1173	391	43,4	55,2	58,6	62,5	45,3	54,5	48,3	US22-Familie
E24	966	322	35,7	52,4	58,3	58,6	45,7	48,8	45,2	US22-Familie
E25	2097	699	78,6	49,3	51,1	53,6	36,7	36,5	32,6	UL25-Familie
e25.1	1365	455	51,6	47,0	49,4	55,6	35,4	31,4	29,7	US22-Familie
e25.2	957	319	35,7	38,1	37,8	46,4	14,7	15,2	12,0	US22-Familie
E26	741	247	27,3	49,4	58,4	57,9	39,1	50,3	41,8	US22-Familie
E27	1971	657	76,0	51,3	55,2	62,6	41,5	52,4	42,8	-
E28	1149	383	43,4	53,7	53,8	59,3	47,3	45,8	41,6	US22-Familie
e29.1	411	137	15,6	44,8	48,7	46,1	26,8	29,7	21,9	-
E31	1995	665	75,3	54,2	55,8	62,0	45,2	41,2	39,1	-
E32	1851	617	69,9	44,7	48,8	52,1	31,2	34,3	38,0	Tegument phosphoprotein
E33	1417	445	49,8	61,8	66,1	73,8	57,4	65,9	65,2	GPCR-Familie
E34	1821	607	69,6	51,6	54,3	55,5	38,7	38,5	37,7	Nuclear egress
E35	1518	506	57,4	51,6	51,3	60,4	45,7	39,6	45,8	UL25-Familie
E36	1502	475	53,6	57,6	58,6	64,0	57,6	58,9	53,5	US22-Familie
E37	966	322	36,3	50,3	54,7	54,9	39,2	46,8	40,5	-
E38	1542	514	56,8	50,2	52,9	58,6	34,1	36,8	34,2	-
e38.5	435	145	16,1	51,5	51,2	49,1	33,1	31,5	26,1	-
e39	513	171	19,4	42,9	43,0	46,2	27,3	18,8	22,2	-
e40	372	124	14,0	51,7	51,9	54,9	32,1	40,7	38,3	-
e41	384	128	13,7	50,7	52,3	50,6	30,0	36,7	33,3	-
e41.1	168	56	6,0	56,0	51,7	49,4	44,6	46,6	37,9	-
e42	366	122	13,2	49,7	45,0	50,9	30,5	22,7	22,2	-
E43	1482	494	55,8	51,7	54,1	56,1	43,8	43,8	39,1	US22-Familie
E44	1161	387	43,0	62,1	66,8	75,6	63,6	70,8	68,7	DNS Binding BP
E45	3042	1014	111,7	50,5	51,6	60,9	41,5	42,1	41,8	Ribonukleotid-Reduktase
E46	885	295	33,2	66,1	68,5	77,4	69,5	76,6	73,9	Minor Capsid Binding Protein
E47	2877	959	110,8	58,5	56,7	65,8	54,9	53,2	55,5	-
E48	6090	2030	231,3	56,0	56,2	64,3	50,1	52,8	50,3	-
e48.2	240	80	8,4	59,3	57,5	63,7	58,6	51,5	50,0	-
E49	1491	497	57,0	63,9	65,5	73,4	70,4	72,4	72,5	-
E50	813	271	30,6	57,5	59,2	63,5	50,5	51,1	51,7	-
E51	327	109	12,2	65,7	72,5	72,1	62,0	71,7	58,9	-
E52	1521	507	58,5	63,6	66,9	75,2	61,8	69,3	67,0	-
E53	843	281	32,7	62,6	64,4	72,2	63,0	58,1	61,7	-
E54	3123	1041	117,7	61,2	65,0	66,4	61,4	67,8	57,7	DNS-Polymerase
E55	2640	880	98,8	56,6	57,6	60,4	54,5	55,1	52,9	gB
E56	2322	774	86,4	66,3	76,4	70,9	64,3	77,5	66,4	-
E57	3489	1163	130,1	54,8	65,5	65,0	51,7	68,3	51,3	Major DNS-binding protein
ORF 4	474	158	18,0							-

ORF	Länge (Nt)	Länge (AS)	MW (kD)	Nukleotid Identität (%)			Protein Identität (%)			Funktion Genfamilie
				RCMV-E		RCMV-M	RCMV-E		RCMV-M	
				RCMV-M	MCMV	MCMV	RCMV-M	MCMV	MCMV	
E69	1914	638	72,9	48,3	53,6	52,3	31,0	39,3	32,9	-
E70	2652	884	102,2	54,5	60,0	63,4	46,3	58,7	49,7	Helicase Primase
E71	729	243	27,6		59,7			58,5		-
E72	1026	342	38,0	55,3	53,3	58,6	44,8	36,5	36,9	UTPase
e73.5	1650	78	8,5		52,5			39,8		-
E73	366	122	13,8	57,4	52,0	56,0	50,0	43,6	46,1	-
e74	1086	362	41,5	44,8	47,8	43,2	24,5	26,7	23,1	-
E75	2151	717	81,4	53,6	54,9	60,9	49,7	50,6	45,6	gH
E76	756	252	28,5	58,9	62,1	68,3	51,8	51,8	52,1	-
E77	1743	581	65,1	59,4	60,6	65,9	60,2	62,8	56,3	UL25-Familie
E78	1314	438	47,6	45,5	46,1	48,7	21,9	24,8	22,1	GPCR-Familie
E79	777	259	29,5	62,9	66,0	75,0	67,2	72,2	71,4	-
E80	1686	562	61,5	51,9	50,4	58,4	43,2	44,9	44,2	-
E82	1707	569	63,1	45,5	44,4	52,4	28,2	23,4	30,8	UL82-Familie
E83	1770	590	66,9	44,4	43,5	51,4	26,0	19,7	25,0	UL82-Familie
E84	1656	552	61,9	45,1	48,5	55,4	33,3	35,6	33,3	UL82-Familie
E85	903	301	33,4	67,0	67,9	74,4	68,0	72,1	68,6	Minor Capsid Protein
E86	4044	1348	152,1	69,5	69,8	80,5	75,9	77,3	77,2	Major Capsid Protein
E87	2481	827	93,6	65,0	62,6	73,1	71,9	69,0	71,8	-
E88	1239	413	46,0	55,4	58,9	64,5	53,9	61,5	53,8	-
E89	6329	671	76,9	72,3	74,3	83,6	83,8	86,4	84,6	-
e90	807	269	30,2	42,6	48,4	46,0	21,5	27,7	20,8	-
E91	282	94	10,2	63,4	68,4	61,3	40,8	59,1	41,2	-
E92	687	229	25,5	69,1	72,2	78,2	77,0	80,3	81,5	-
E93	1530	510	58,4	52,7	56,2	63,3	46,2	53,4	50,6	-
E94	1023	341	37,4	52,2	54,6	64,0	48,1	47,1	51,3	-
E95	1155	385	42,3	64,6	65,0	72,0	68,1	67,9	65,0	-
E96	372	124	13,8	55,8	55,9	59,3	50,0	45,9	42,5	-
E97	1710	570	63,5	54,6	59,3	60,5	53,6	56,6	52,8	Phosphotransferase
E98	1599	533	59,4	57,4	57,7	63,3	48,3	50,6	46,8	Exonuclease
E99	291	97	10,3	49,3	53,1	56,9	44,4	43,0	40,3	Tegument Phosphoprotein
E100	1056	352	39,7	66,7	71,0	77,5	68,8	76,6	70,2	gM
E102	2187	729	81,9	49,0	52,3	55,9	29,5	43,4	28,8	Helicase-Primase Untereinheit
E103	789	263	29,7	59,6	65,3	64,4	45,2	56,9	44,9	Helicase-Primase Untereinheit
E104	2028	676	78,1	62,2	64,5	71,6	60,0	68,3	63,5	-
E105	2640	880	99,5	59,1	63,8	66,6	58,1	70,7	57,8	DNS-Helicase
ORF 5	336	112	12,8							-
E112	1385	311	33,5	53,8	55,5	54,9	41,8	35,4	41,9	Phosphoprotein
E113	1107	369	40,1	48,5	54,9	47,4	30,5	43,1	26,8	-
E114	753	251	28,3	63,2	65,3	67,7	63,2	71,2	68,1	Uracil DNS Glycosylase
E115	801	267	30,5	53,1	54,7	54,0	38,0	47,1	39,4	gL
E116	1326	442	47,8	43,2	45,9	43,9	15,3	20,7	14,3	-
e117	1230	410	45,5	44,7	45,3	44,3	27,2	24,9	20,7	-
E118	831	265	30,5	48,1	47,8	49,7	30,4	34,8	25,5	-
e119.1	630	210	23,8	51,9	47,0	45,7	30,9	28,4	24,3	-
e119.2	321	107	12,0	51,2	48,0	46,1	34,2	29,8	28,9	-
ORF 6	237	79	9,0							-
e120.1	951	317	43,6		45,0			25,8		-
E121	1737	579	64,4	43,3	42,9	43,3	13,3	15,3	13,2	-
IE2	3370	521	58,3	47,3	46,6	50,0	29,5	31,8	35,4	Immediate Early Protein 2
IE1	1886	567	63,0	44,7	45,7	44,6	18,5	21,8	20,5	Immediate Early Protein 1
e124	246	82	8,9	39,7	62,8	38,9	12,9	58,6	12,4	-
e127	855	285	31,8							OX2 Homolog
e128	1239	413	46,6	52,6	50,4	51,3	40,3	42,3	42,7	US22-Familie
ECK	1001	306	34,4	43,9	43,5	44,1	19,7	18,2	21,9	CC-Chemokine
e133/sgg1	1148	296	32,9	45,7	46,1	45,5	29,8	29,1	24,1	-
e135	381	127	14,0	41,9	43,5	48,1	26,8	27,9	33,1	-
e136	591	197	22,9	48,9	50,9	47,2	39,7	37,2	34,1	-
e137	987	329	36,0	50,3	48,2	48,9	34,7	34,3	38,3	-
e138	1572	524	58,5	42,4	43,4	43,8	22,8	20,5	21,9	FCR
e139	1899	633	71,8	52,5	55,9	54,2	44,5	49,3	42,8	US22-Familie
e140	1392	464	52,7	51,8	54,4	51,8	44,9	48,5	45,1	US22-Familie
e141	1464	488	56,3	51,8	52,8	53,5	41,5	44,2	44,8	US22-Familie
e142	1338	446	50,9	57,1	59,1	61,0	51,1	56,7	57,1	US22-Familie
e143	1581	527	59,5	54,1	56,0	54,9	49,3	47,9	43,2	US22-Familie
e144	1149	383	43,7	48,2	49,0	46,3	29,6	33,2	31,5	MHCI-Homolog
e149	1116	372	42,0	41,4	41,4	39,9	15,1	11,4	10,3	-
e152	1173	391	44,9	42,9	46,0	39,8	15,2	20,9	15,5	M145-Familie
e153.1	1101	367	43,0		41,0			22,3		M145-Familie
e153	1218	406	46,5		42,5			20,5		M145-Familie
ORF 7	1110	370	42,7							-
e152.1	1089	363	41,6		42,9			19,5		M145-Familie
e152.2	1299	433	49,5	44,2	40,7	42,8	16,0	17,4	18,2	M145-Familie
e155	945	315	35,6	44,7	42,0	40,4	22,7	16,7	16,8	M145-Familie
e155.1	1074	358	41,3	41,3	42,9	40,4	19,4	21,7	16,8	M145-Familie
ORF 8	348	116	12,8							-
e159	1359	453	48,9		45,1			24,2		-
e160	804	268	30,2	42,7	41,0	43,4	23,6	16,7	19,4	-

ORF	Länge (Nt)	Länge (AS)	MW (kD)	Nukleotid Identität (%)			Protein Identität (%)			Genfamilie Funktion
				RCMV-E	RCMV-M		RCMV-E	RCMV-M		
				RCMV-M	MCMV	MCMV	RCMV-M	MCMV	MCMV	
ORF 9	339	113	12,7							
ORF 10	399	133	14,8							
e164	1161	387	43,0	42,9	46,8	43,7	18,6	31,1	21,5	-
e166	1101	367	41,6	44,9	45,4	48,6	27,3	25,7	26,7	-
e167	1284	428	47,6	43,9	53,4	44,2	14,0	41,5	13,6	-
RCTL2	822	183	21,5							
ORF 11	744	248	27,6							
ORF 12	546	182	20,3							
ORF 13	639	213	22,8							
ORF 14	363	121	13,1							
ORF 15	447	149	16,4							
ORF 16	201	67	7,6							
ORF 17	336	112	12,3							
ORF 18	351	117	12,6							
ORF 19	474	158	18,0							

Nukleinsäuresequenzvergleich

Die Sequenzidentität der drei Viren auf Nukleinsäureebene schwankt zwischen minimal 38 % (e25.2/m25.2) und maximal 80 % (R86/M86). Für 70 (60 %) der 116 untersuchten Leserahmen wurde eine maximale Sequenzübereinstimmung zwischen RCMV-M und MCMV ermittelt. In nur 29 (25 %) Fällen konnte eine maximale Sequenzübereinstimmung zwischen den ORF von RCMV-E und MCMV ermittelt werden. Diese Leserahmen sind überwiegend in der hinteren Hälfte des RCMV-E Genoms (nach E103) zu finden. In diesem Zusammenhang ist zu bemerken, dass zu sieben RCMV-E Leserahmen (e20, E71, e120.1, e153.1, e153, e152.1 und e160) nur Homologe in MCMV, aber nicht in RCMV-M existieren. Für die verbleibenden zehn Leserahmen wurde eine maximale Sequenzübereinstimmung zwischen RCMV-E und RCMV-M ermittelt.

Proteinsequenzvergleich

Die Proteinsequenzen der translatierten Leserahmen unterscheiden sich deutlich stärker voneinander als die Nukleotidsequenzen. Die Identitäten schwanken zwischen 10 % (r149/m149) und 86 % (E89/M89). 69 (60 %) der translatierten RCMV-E ORF zeigen eine maximale Sequenzübereinstimmung mit den Homologen aus MCMV. Auffällig ist hier, dass die höchsten Übereinstimmungen bei den konservierten Genen zu finden sind. Zum Beispiel weisen die meisten Proteine der DNS-Replikation (E44, E54, E57, E70 und E105), mit Ausnahme von E102, eine Sequenzübereinstimmung zu den Homologen in MCMV von über 58 % auf. Nur 28 (24 %) RCMV-E Proteine zeigen eine erhöhte Sequenzidentität zu Homologen in RCMV-M. Eine maximale Übereinstimmung zwischen RCMV-M und

MCMV konnte nur in 18 Fällen ermittelt werden. Die geringsten Sequenzidentitäten (<31 %) zwischen den translatierten RCMV-E Leserahmen und den Homologen in RCMV-M und MCMV findet man am Ende des Genoms. Hier werden die putativen Mitglieder der m145-Genfamilie kodiert.

Zur Identifizierung der Unterschiede im Genomaufbau und fehlender Gene wurden Genkarten der drei Viren erstellt und konservierte Genblöcke identifiziert (siehe Abbildung 6).

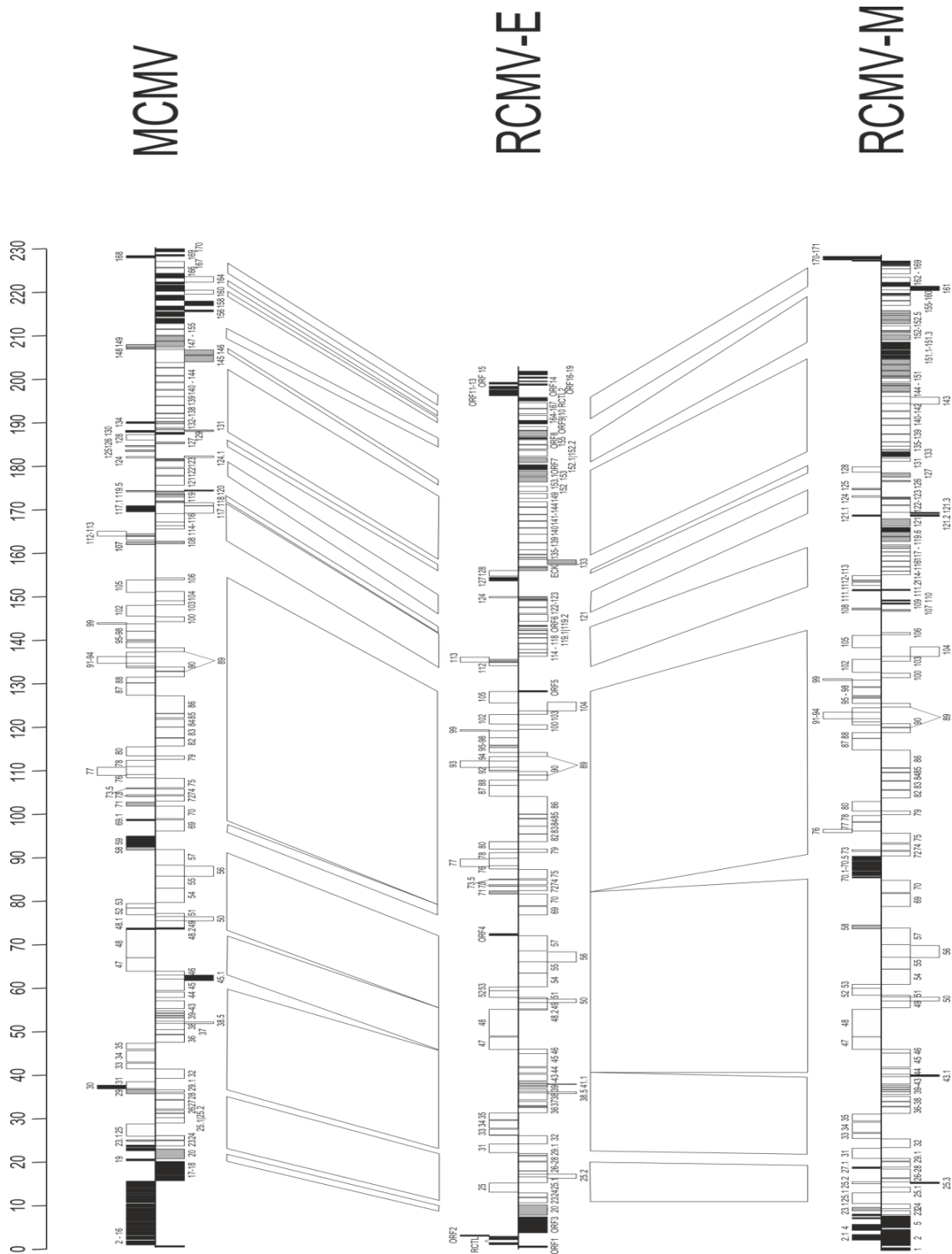


Abbildung 6: Graphische Darstellung der Genkarten von MCMV, RCMV-E und RCMV-M.

Jedes Genom ist durch eine Linie skizziert. ORFs oberhalb sind auf dem Code-Strand, jene unterhalb auf dem codogenen Strang kodiert. Weiße Boxen entsprechen ORFs, die von allen drei CMVs kodiert werden und graue Boxen repräsentieren ORFs, die nur in zwei der drei Viren zu finden sind. Gene, die nur in einem einzelnen Genom kodiert werden, sind durch schwarze Boxen gekennzeichnet. Exons gespleißter ORFs sind, sofern sie nicht in direkter Nachbarschaft liegen durch Linien verbunden. Überlappende ORFs sind nach oben bzw. unten abgesetzt. Die Blöcke zwischen den Genkarten repräsentieren Genombereiche identischer Genabfolgen. Die Genkarten für MCMV basieren auf Acc.-No.: NC_004065 (Rawlinson et al., 1996) und die für RCMV-M auf Acc.-No. AF232689 (Vink et al., 2000).

Konservierte Domänen und Genfamilien im RCMV-E Genom

Cytomegaloviren kodieren im zentralen Bereich für die konservierten Proteine der Virusreplikation (Davison et al., 2003). Sie beinhalten die Glykoproteine, die Proteine der DNS-Replikation und des Nukleinsäuremetabolismus, die Strukturproteine und die im *major immediate early*-Lokus kodierten Proteine.

Neben diesen funktionellen Gruppen sind bei CMVs 14 Genfamilien identifiziert worden. Zwölf dieser Familien (US1, US2, US6, US12, US22, UL14, UL18, UL25, UL82, UL146, RL11 und GCR) wurden in HCMV (Chee et al., 1990; Davison et al., 2003) und zwei (m02 und m145) in MCMV beschrieben (Rawlinson et al., 1996). Die Zusammenfassung von Genen zu einer gemeinsamen Familie basiert entweder auf gemeinsamen Motiven der von ihnen kodierten Proteine, oder einer Sequenzidentität der Proteine untereinander. In der *conserved domain database* (CDD) (Marchler-Bauer et al., 2010) sind diese Familien mit ihren charakteristischen Motiven hinterlegt. Analog zu den Acc.-No. der NCBI-Datenbank sind den Proteinfamilien pfam-No. zugewiesen. Die Proteine der m145-Familie verfügen über keine definierte Domäne. Sie ist durch die Sequenzähnlichkeit der Mitglieder der Familie definiert (Rawlinson et al., 1996).

Basierend auf der Annahme, die RCMV-E Proteine erfüllen im Rahmen des Infektionszyklus die gleichen Funktionen wie die korrespondierenden Homologe in MCMV und RCMV-M, wurden diese Proteine noch einmal gesondert analysiert. Ebenso wurde durch eine BlastP-Analyse untersucht, welche Genfamilien in RCMV-E vorhanden sind.

Glykoproteine

Die Leserahmen E55, E75, E100 und E115 kodieren für die Glykoproteine gB, gH, gM und gL. Alle vier Proteine weisen eine höhere Sequenzidentität zu den Homologen in MCMV auf. Diese schwankt zwischen 47,1 % (gL) und 76,6 % (gM). Alle Proteine sind in der äußeren Membran lokalisiert und für die Bindung an die Zelloberfläche zu Beginn der Infektion verantwortlich. Ein weiteres, in allen drei Viren konserviertes Protein wird vom Leserahmen e138 kodiert. Die Übereinstimmung zu den beiden Fc-Rezeptoren m138 und r138 ist mit ca. 34 % verhältnismäßig niedrig.

Proteine der DNS-Replikation und des Nukleotidmetabolismus

Wie bei HCMV, MCMV und RCMV-M wurden in RCMV-E sechs Leserahmen für Proteine gefunden, für die eine Beteiligung an der DNS-Replikation zu vermuten ist. Es wurden Homologe des DNS-Bindeproteins (E44), der DNS-Polymerase (E54), des *Major DNA-binding Proteins* (E57) und der drei Helicase-Primase Untereinheiten (E70, E102, E105) gefunden. Die Sequenzidentität dieser Proteine zu den MCMV-Homologen variiert von 43,4 % (E102) bis 70,8 % (E44). Die Übereinstimmung zu den RCMV-M Homologen ist in allen Fällen geringer und schwankt zwischen 29,5 % (E102) und 63,6 % (E44).

Bisher wurden in MCMV und RCMV-M jeweils nur vier Proteine identifiziert, die am Nukleotidmetabolismus beteiligt sind (Rawlinson et al., 1996; C Vink et al., 2000). Homologe dieser Proteine (Ribonukleotidreduktase (E45), UTPase (E72), Phosphotransferase (E97), Uracil DNS-Glycosylase (E114)) wurden ebenfalls in RCMV-E gefunden. Mit Ausnahme von E72 (MCMV: 36,5 %; RCMV-M 44,8 %), weisen alle Proteine eine höhere Sequenzidentität (42,1 % bis 56,6 %) zu den MCMV-Homologen auf.

Strukturproteine

Die Strukturproteine bauen das Kapsid und das zwischen Kapsid und Virushülle liegende Tegument auf. Zu allen aus MCMV und RCMV-M bekannten Strukturproteinen wurden Homologe in RCMV-E gefunden.

Das Kapsid wird aus dem *major capsid protein* (E86) und dem *minor capsid protein* (E46) gebildet. Diese Proteine weisen eine überdurchschnittlich hohe Sequenzidentität von 77 % zu den MCMV-Homologen auf.

An der Ausbildung des Teguments sind das *upper matrix protein* (E82), das *lower matrix protein* (E83), sowie das *major tegument phosphoprotein* (E32) und das *small tegument phosphoprotein* (E99) beteiligt. Die beiden Matrixproteine weisen nur eine geringe Sequenzidentität 20 % (E82) bis 28 % (E83) zu den Homologen in MCMV und RCMV-M auf, während die Übereinstimmung der Phosphoproteine zwischen 31% (E32) und 44 % (E99) beträgt. Die Aminosäureidentität zwischen MCMV und RCMV-M bewegt sich bei diesen vier Proteinen im selben Rahmen (R82/M82: 31 %; R83/M83: 33 %; R32/M32: 38 %; R99/M99: 40 %).

Immediate Early (IE)-Proteine

Der für die *Immediate Early*-Gene kodierende *major immediate early* (MIE)-Lokus ist in allen CMV bekannt und kodiert für zwei Proteine. Diese IE-Proteine dienen als Transkriptionsfaktoren für die *Early*-Gene und sind an der Regulation der lytischen und latenten Infektion beteiligt (Stinski & Isomura, 2008). In RCMV-E befindet sich der MIE-Lokus zwischen den Leserahmen E121 und e124 und kodiert für die Proteine IE1 und IE2. RCMV-M und MCMV kodieren ebenfalls in diesem Bereich für die IE-Proteine. In MCMV wird das von den Exons 2,3 und 5 kodierte Protein jedoch nicht als IE2 sondern IE3 bezeichnet (Rawlinson et al., 1996). Die Sequenzidentität zwischen den RCMV-Proteinen IE1 und IE2 zu den Homologen in MCMV und HCMV ist mit 19 bis 31 % sehr niedrig. Untersuchungen des RCMV-E MIE-Lokus und der von ihm gebildeten Transkripte, zeigte eindeutig, dass es sich um die IE-Proteine handelt (Gordon R Sandford et al., 2010).

Genfamilien

Im Rahmen der BlastP-Analysen konnten fünf der 14 für Cytomegaloviren beschriebenen Genfamilien identifiziert werden. Vier dieser Familien US22, UL25, UL82 und GPCR (*G protein-coupled receptor*) sind auch in HCMV beschrieben (Chee et al., 1990). Die m145-Familie wurde erstmals von Rawlinson et. al bei der Sequenzierung von MCMV-Smith beschrieben (Rawlinson et al., 1996).

US22-Familie (pfam02393)

Die US22-Familie ist in allen β -Herpesviren zu finden und zeichnet sich vorwiegend durch die konservierte Domäne ooCCXD/E(X)₁₋₄oXXoG und GXXoXoXWP aus (Chee et al., 1990). „X“ steht in diesen Motiven für eine beliebige Aminosäure und „o“ für eine basische Aminosäure. In RCMV-E wurden übereinstimmende Motive in den Proteinen E23, E24, e25.1, e25.2, E26, E36 E43, e139, e140, e141, e142 und e143 gefunden.

UL25-Familie (pfam04637)

Die UL-25-Familie beinhaltet Proteine die an der Verpackung der DNS in das Virion beteiligt sind (Ali et al. 1996; McNab et al. 1998). Beinhaltet sind die Proteine UL25 und UL35, M25 und M35 bzw. R25 und R35 in HCMV bzw. MCMV und RCMV-M (Chee et al., 1990; Rawlinson et al., 1996; Vink et al., 2000). Die Zuteilung zu dieser Familie basiert nicht auf einem bestimmten Motiv, sondern auf

der Sequenzidentität des untersuchten Proteins zu den Mitgliedern dieser Familie. Die BLAST-Analyse ergab für die drei RCMV-E Proteine E25 und E35 auch E77 eine Zuordnung zu dieser Familie. Da die MCMV und RCMV-M Proteine M77 und R77 bislang nicht als Mitglieder der UL25-Familie beschrieben sind, wurden diese ebenfalls auf eine Sequenzidentität überprüft. Die Analyse von M77 und R77 ergab für diese Proteine ebenfalls eine Zugehörigkeit zur UL25 Familie.

UL82-Familie (pfam05784)

Bei den in der UL82-Familie gruppierten Proteine handelte es sich um Phosphoproteine, die maßgeblich für den Zellzyklusarrest in der G₁-Phase verantwortlich sind (Kalejta & Thomas Shenk, 2003). Sie wurde erstmalig bei der Sequenzanalyse des HCMV (AD169) beschrieben (Chee et al., 1990). Die RCMV-E Phosphoproteine E82, E83 und E84 wurden als Mitglieder der UL82-Familie identifiziert.

GPCR-Familie (pfam00001)

Die GPCR-Familie ist durch ihre Ähnlichkeit zu G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gekennzeichnet. Alle verfügen über eine 7-Transmembran-Domäne, während die umliegenden Sequenzbestandteile stark variieren können (Vink et al., 1999). Wie auch in MCMV und RCMV-M wurden nur zwei Proteine identifiziert, E33 und E78, die über eine 7-TM-Domäne verfügen. E33 zeigt mit bis zu 66 % eine gute Sequenzübereinstimmung zu M33 und R33, während E78 mit maximal 24 % Sequenzidentität nur eine sehr geringe Identität zu M78 und R78 aufweist.

m145-Familie (keine pfam)

Die m145-Familie umfasst bei MCMV 11 und bei RCMV-M 15 Proteine (Rawlinson et al., 1996; Vink et al., 2000). Da sich diese Proteinfamilie durch kein definiertes Motiv auszeichnet, sondern die Zugehörigkeit zu dieser Familie sich aus der Sequenzähnlichkeit der Proteine untereinander ergibt (Rawlinson et al., 1996), wurden vorläufig alle RCMV-E Proteine, die als Homologe zu Proteinen der m145-Familie identifiziert wurden, dieser Proteinfamilie zugeordnet. Insgesamt konnten die Proteine e152, e152.1, e152.2, e153, e153.1, e155 und e155.1 als Homologe von Proteinen dieser Familie identifiziert werden. Gemäß dieser vorläufigen Einteilung kodiert RCMV-E für nur sieben Proteine der m145-Familie.

Leserahmen ohne Homologe in MCMV und RCMV-M

Die drei ORFs RCTL2, e127 und ORF8 kodieren für Proteine, die bislang nicht in anderen CMVs beschrieben wurden. e127 ist ein Homolog des Rattenproteins Ox2 (CD200) und bindet an den Rezeptor CD200R (Foster-Cuevas et al., 2011). Die Expression des zweiten viralen C-Typ-Lektin-ähnlichen Proteins und ORF8 wurde durch RACE-Analysen in der Arbeitsgruppe nachgewiesen (Eckhardt, 2007; Friedrich, 2007), jedoch konnte keinem der beiden Proteine bislang eine Funktion zugeordnet werden.

Bei den 18 verbleibenden ORFs (ORF1 - 7 und ORF9 - 19) handelt es sich um putative Leserahmen, zu denen keine Homologe identifiziert werden konnten und deren Expression noch nicht bestätigt wurde. Sie befinden sich, ähnlich den putativen Proteinen von MCMV und RCMV-M, vorwiegend an den Enden des Genoms. Die beiden Leserahmen ORF4 und ORF5 sind nicht an den Enden lokalisiert und repräsentieren Positionshomologe zu Proteinen, die sowohl in MCMV als auch RCMV-M kodiert sind. ORF4 befindet sich am entsprechenden Locus von m58 und r58 und ORF5 an der Position von m106 bzw. r106. Die Sequenzunterschiede der ORFs zu ihren Positionshomologen sind jedoch zu groß um sie, entsprechend der definierten Regeln, als e58 oder e106 zu bezeichnen.

4.1.3 Phylogenetische Eingruppierung von RCMV-E

Für die phylogenetische Eingruppierung von Cytomegaloviren wird meist ein repräsentatives Set konservierter Proteine aus verschiedenen Schritten des Replikationszyklus verwendet (McGeoch, et al., 2000). Welche Proteine für die Analyse herangezogen werden, ist nicht standardisiert und richtet sich nach den verfügbaren Sequenzinformationen der zu vergleichenden Viren. Für die Eingruppierung des RCMV-E wurden die Proteine der DNS-Polymerase (E54), des Glykoproteins B (E55), der Terminase Untereinheit (E56), des *single strand binding protein* (E57), des *major capsid protein* (E86) sowie der Terminase (E89) und der DNS-Helicase (E105) untersucht.

Die Auswahl der Vergleichsviren spielt eine ebenso wichtige Rolle wie die Auswahl der Proteine. In vorangegangenen Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass es sich bei RCMV-E um ein β -Herpesvirus im Genus *Muromegalovirus* handelt (Ehlers et al., 2007; Teterina, Richter, Matuschka, Ehlers, & Sebastian Voigt, 2009). Dieses Genus beinhaltet auch die Viren RCMV-M und MCMV. Somit

konnte bei der Auswahl der Vergleichsviren darauf verzichtet werden, α - und γ -Herpesviren in die phylogenetische Analyse zu integrieren. Für die Beantwortung der Frage, ob es sich bei RCMV-E um eine eigene Virusspezies oder nur einen Subtyp von RCMV-M handelt, musste das Set an Viren zwei Charakteristika erfüllen. 1. Es musste eine ausreichende Anzahl distinkter Virusspezies enthalten sein, die sich anhand der ausgewählten Proteine voneinander unterscheiden lassen. 2. Es sollten auch verschiedene Subtypen einer Spezies enthalten sein, die eine gemeinsame phylogenetische Gruppe (Klade) bilden. Nur wenn diese beiden Grundvoraussetzungen im ausgewählten Modell klar zu trennen sind, kann das Ergebnis als repräsentativ betrachtet werden.

Die Auswahl der distinkten CMV-Spezies umfasste die Nagerviren MCMV, RCMV-M und das CMV der Meerschweinchen (GPCMV), die beiden Primatenviren Rhesus-CMV (RhCMV) und Schimpansen-CMV (ChCMV) sowie das humane Cytomegalovirus (HCMV). Die Subspezies wurden durch die fünf MCMV-Isolate Smith, K181, G4, WP15B und C4A sowie die beiden HCMV-Varianten AD169 und Merlin repräsentiert.

Das verwendete Jones-Taylor-Thornton-Modell (JTT) (Jones et al., 1992) berücksichtigt nicht nur die direkten Sequenzunterschiede, sondern auch notwendige Übergangsmutationen und Austausch zwischen basischen, neutralen und sauren Aminosäuren. Zur Erhöhung der Verlässlichkeit der Stammbäume wurden folgende zusätzliche Parameter in die Berechnung integriert: 1) Es wurde für alle Viren die gleiche Mutationsrate angenommen (+G), 2) ein geschätzter Anteil invarianter Aminosäuren (+I), bedingt durch die funktionellen Domänen der Proteine und 3) die Häufigkeit der Aminosäuren in der Proteinsequenz (+F).

Zur statistischen Absicherung wurden 1.000 Wiederholungen der Stammbaumberechnung durchgeführt und der Consensus-Stammbaum berechnet. Anhand des dabei ermittelten Bootstrap-Werts lässt sich eine Aussage darüber treffen, wie verlässlich die Verzweigungen im Stammbaum sind. Die Bootstrap-Werte geben den prozentualen Anteil der Einzelbäume an (in diesem Fall 1.000), bei denen die jeweilige Verzweigung errechnet wurde. In Fachbüchern werden meist Bootstrap-Werte über 50 - 70 % als verlässlich angegeben (Knopp & Müller, 2009; Lemey et al., 2009). Bei dem vorliegenden Datenset konnte von einer hohen Verwandtschaft

der Viren ausgegangen werden, sodass nur Bootstrap-Werte über 70 berücksichtigt wurden.

Zur Vereinheitlichung der Darstellung wurde für alle Bäume das GPCMV als Wurzel verwendet. Bevor die Eingruppierung von RCMV-E betrachtet wurde, wurde die Erfüllung der Grundvoraussetzungen überprüft. Sämtliche MCMV-Varianten bilden in allen Stammbäumen eine gemeinsame Klade, die sich deutlich von beiden RCMV abgrenzt. Die beiden HCMV-Isolate AD169 und Merlin bilden ebenfalls eine gemeinsame Klade. Dass die unterschiedlichen Virusspezies zuverlässig voneinander getrennt werden, wird durch die beiden Primaten-CMV's gezeigt, die sich mit Bootstrap-Werten von über 75 voneinander und auch von HCMV abgrenzen. Da die Grundvoraussetzungen mit statistischer Absicherung in Form von Bootstrap-Werten erfüllt waren, konnte die Eingruppierung von RCMV-E als verlässlich angesehen werden.

Die DNS-Polymerase (Abbildung 7 A) zeigt eine etwas höhere Verwandtschaft zu RCMV-M als zu den Proteinen der unterschiedlichen MCMV. Die Glykoproteine B (Abbildung 7 B) von RCMV-M und MCMV weisen eine höhere Verwandtschaft zueinander als zum entsprechenden RCMV-E Protein auf. In allen anderen Fällen (Abbildung 7 C - G) ist die Abgrenzung von RCMV-E zu MCMV und RCMV-M deutlich unterstützt und zeigt eine nähere Verwandtschaft zu MCMV. Im Einzelnen betrachtet grenzen sich die Einzelproteine des RCMV-E mit verlässlichen Bootstrapwerten (>85) von den Proteinen von MCMV und RCMV-M ab. Durch das Zusammenfügen aller Proteinsequenzen zu einem artifiziellen Fusionsprotein wurde die Translation eines „Mini-Genoms“ der einzelnen Viren generiert. Ziel dieses Ansatzes war es zu prüfen, ob die Sequenzunterschiede, die zur abweichenden Eingruppierung der RCMV-E DNS-Polymerase und des Glykoproteins B führten, mit den Sequenzunterschieden der anderen Proteine zu einer veränderten Eingruppierung von RCMV-E führen würden. Dieses Fusionsprotein spaltet sich im phylogenetischen Stammbaum (Abbildung 7 H) eindeutig von den Fusionsproteinen von RCMV-M und MCMV ab und bestätigt die Ergebnisse der Einzelstammbäume. Da die Kladenbildung der Vergleichsviren sich ebenfalls bestätigt ist es unwahrscheinlich, dass es sich bei dieser Abgrenzung um ein Artefakt handelt.

Aufgrund dieser Daten ist davon auszugehen, dass sich RCMV-E nicht in jüngerer Zeit aus einem der anderen Cytomegaloviren entwickelt hat. Vielmehr ist anzunehmen, dass alle drei Viren sich aus einem gemeinsamen Vorläufervirus entwickelt haben und als distinkte Spezies zu betrachten sind.

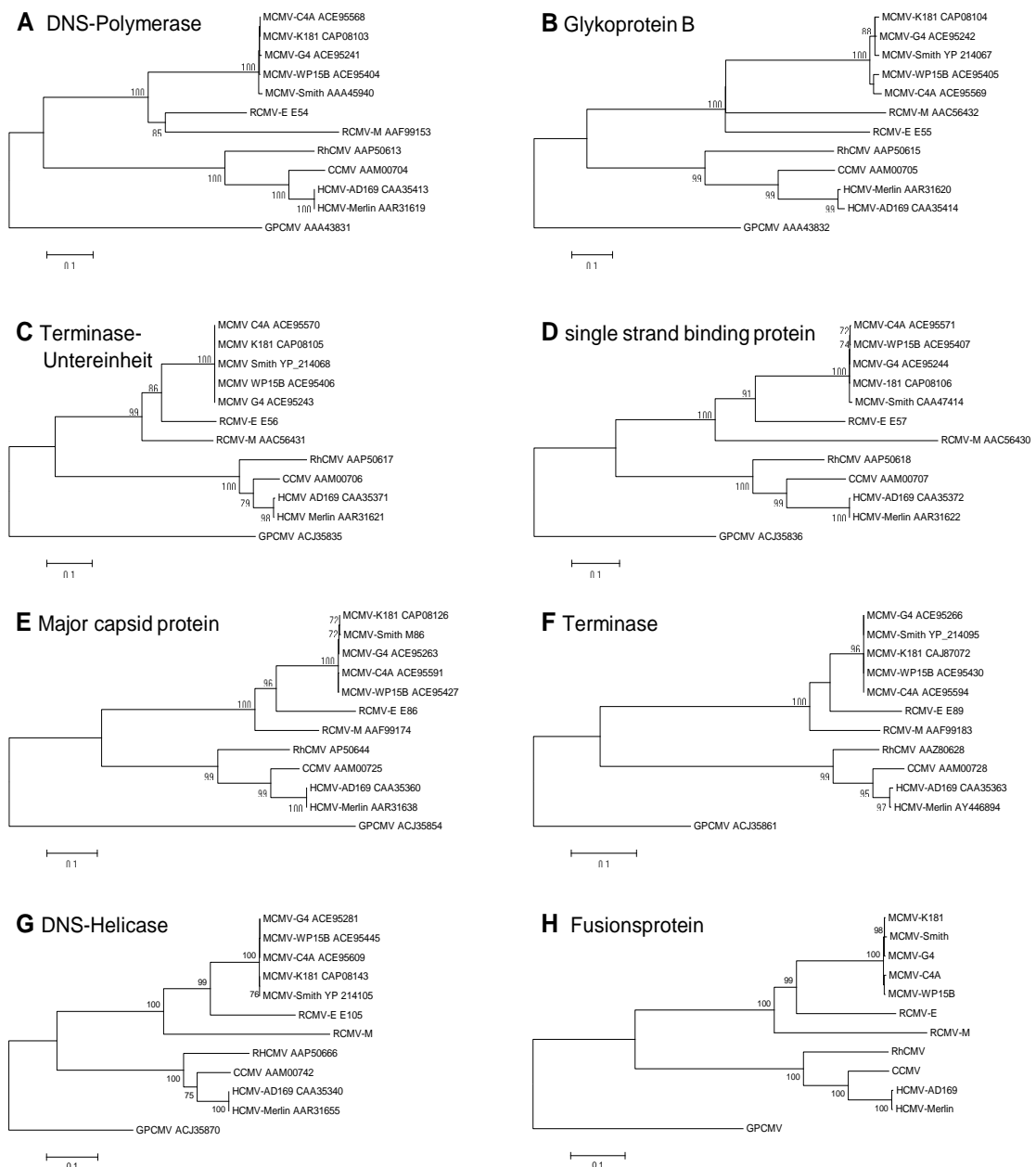


Abbildung 7: Phylogenetische Analysen konservierter CMV-Gene.

Sowohl die Stammbäume der einzelnen Proteine (**A - G**) als auch der des artifizellen Fusionsproteins (**H**) wurden durch eine *maximum likelihood* Analyse unter Verwendung des JTT+F+G+I Modells erstellt (siehe auch 3.5.2) und jeweils das GPCMV-Protein als Wurzel festgelegt. Es sind jeweils die aus 1.000 Replikaten errechneten Consensus-Stammbäume dargestellt. Die Ergebnisse der Bootstrap-Analyse sind an den jeweiligen Verzweigungen angegeben. Der Skalierungsbalken repräsentiert 0,1 Austausche je Position.

4.2 Molekulare und funktionelle Charakterisierung des RCMV C-Typ-Lektin ähnlichen Proteins (RCTL)

Voigt et al. beschrieben 2001 den Leserahmen eines C-Typ-Lektin-ähnlichen Proteins (RCTL) mit einer für eukaryotische Gene typischen Intron-Exon-Struktur. Anhand vergleichender Wachstumskurven des RCMV-E wt mit einer RCTL-Deletionsmutante konnte bei der Erstbeschreibung des RCTLs gezeigt werden, dass das Protein für die Replikation *in vitro* nicht essentiell ist (Voigt et al., 2001).

4.2.1 Struktur von RCTL und dessen Homologen

In vorangegangenen Untersuchungen konnte bereits die Verwandtschaft zwischen RCTL und dem Clr-B aus *Rattus norvegicus* (rClr-b) nachgewiesen werden (Voigt et al., 2007). Ergänzend dazu wurde RCTL mit dem RCMV-M Leserahmen r153 und dem zweiten RCMV-E Lektin RCTL2 verglichen. Die drei viralen Proteine verfügen über die gleiche Intron-Exon-Struktur wie das zelluläre Homolog rClr-b. Dies deutet darauf hin, dass alle drei Gene im Zug der Anpassung an den Wirt aus dessen Genom übernommen wurden. Die begrenzte Kodierungskapazität viraler Genome bewirkt im Laufe der Evolution eine Verkürzung auf diese Art erworbener Gene, so werden die nicht kodierenden Introns und Proteindomänen, die im viralen Kontext keine Rolle spielen, verkürzt. Der ORF des zellulären rClr-b ist mit 8,7 kBp signifikant größer als die Leserahmen von r153 (0,8 kBp), RCTL (1,9 kBp) und RCTL2 (0,8 kBp) (Abbildung 8 B). Neben der drastischen Reduktion der Intronlängen wurden auch die C-terminal gelegenen cytoplasmatischen Domänen von RCTL und r153 verkürzt und stark modifiziert (Abbildung 8 A), wodurch potentiell zelluläre Regulationsmechanismen in ihrer Funktion eingeschränkt werden könnten. Die für RCTL2 und r153 kodierenden Bereiche bestehen aus nur 4 Exons, sind beide mit nur 0,8 kBp ähnlich groß und befinden sich am Ende des jeweiligen Genoms. Sequenzvergleiche (Abbildung 8 A & C) zeigen jedoch eine höhere Übereinstimmung zwischen RCTL und r153. Die positionellen und strukturellen Unterschiede sprechen dafür, dass RCMV-M und RCMV-E die Proteine unabhängig voneinander erworben haben.

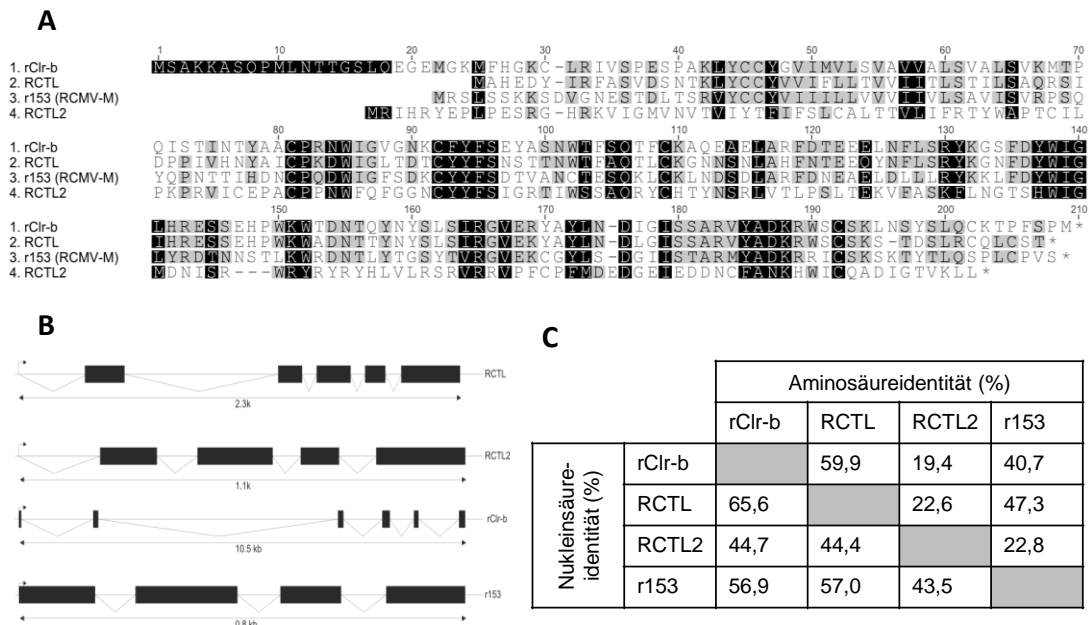


Abbildung 8: Gegenüberstellung des Genaufbaus von RCTL und dessen Homologen

A Sequenzvergleich der Proteinsequenzen des Ratten Clr-b (rClr-b), RCMV-M Lektin r153 und der beiden RCMV-E C-Typ Lektine (RCTL und RCTL2). **B** Schematische Darstellung der Intron-Exon Struktur der vier Proteine. Die Boxen repräsentieren die Exons und die Linien die Introns. Unter dem jeweiligen Gen ist die Länge des Leserahmens in kbp angegeben. **C** Nukleinsäure- bzw. Aminosäureidentität von rClr-b, RCTL, RCTL2 und r153 gemessen in Prozent, bestimmt durch den direkten Vergleich mittels Geneious.

Die Identität von rClr-b zu RCTL und r153 beträgt auf Nukleinsäureebene etwa 66 % bzw. 57 % und auf Proteinebene 60 % bzw. 41 %. Die Identität zu den anderen Proteinen fällt bei RCTL2 mit 44 % und ca. 20 % deutlich niedriger aus. Es ist möglich, dass es sich bei RCTL2 um ein virales C-typ-Lektin-ähnliches Protein mit immunevasiver Bedeutung handeln könnte, dessen Funktion sich jedoch von RCTL und r153 unterscheidet. Bei Untersuchungen konnten bereits Expression und die Lokalisierung an der Zelloberfläche, aber noch keine Funktion nachgewiesen werden (Friedrich, 2007).

Zusammengenommen legen die Ergebnisse den Verdacht nahe, RCTL und r153 könnten funktionell wie auch das rClr-b an der NKRP1-vermittelten Regulation der NK-Zell-Aktivität beteiligt sein.

4.2.2 Regulation von RCTL und rClr-b in RCMV-E infizierten REFs

Voruntersuchungen mittels konventioneller RT-PCR zeigten, dass unmittelbar nach Infektion von REF mit RCMV-E wt RCTL exprimiert und die Transkription des endogenen rClr-b blockiert wird (Voigt et al., 2007).

Zur detaillierten Aufklärung der Kinetik wurden quantitative PCRs (qPCR) für die oben genannten Gene etabliert. Als Referenzgen wurde das zelluläre c-myc

ausgewählt. Neben dem RCMV-E wt Virus wurden noch eine RCTL-Deletionsmutante (RCMV-E Δ RCTL) und eine Revertante (RCMV-E REV), in der RCTL wieder lokusgetreu eingesetzt wurde, für die Expressionsanalyse verwendet. Binnen 72 h nach Infektion wurden Proben entnommen und die Expression von RCTL, rClr-b und CLEC2D5, bezogen auf c-myc, bestimmt (Abbildung 9). Sowohl CLEC2D5 und r-Clr-b gehören zu den CLEC2D-Liganden (Hao et al., 2006). In den Transkriptionsanalysen diente es als unbeeinflusste Kontrolle für die Expression von rClr-b.

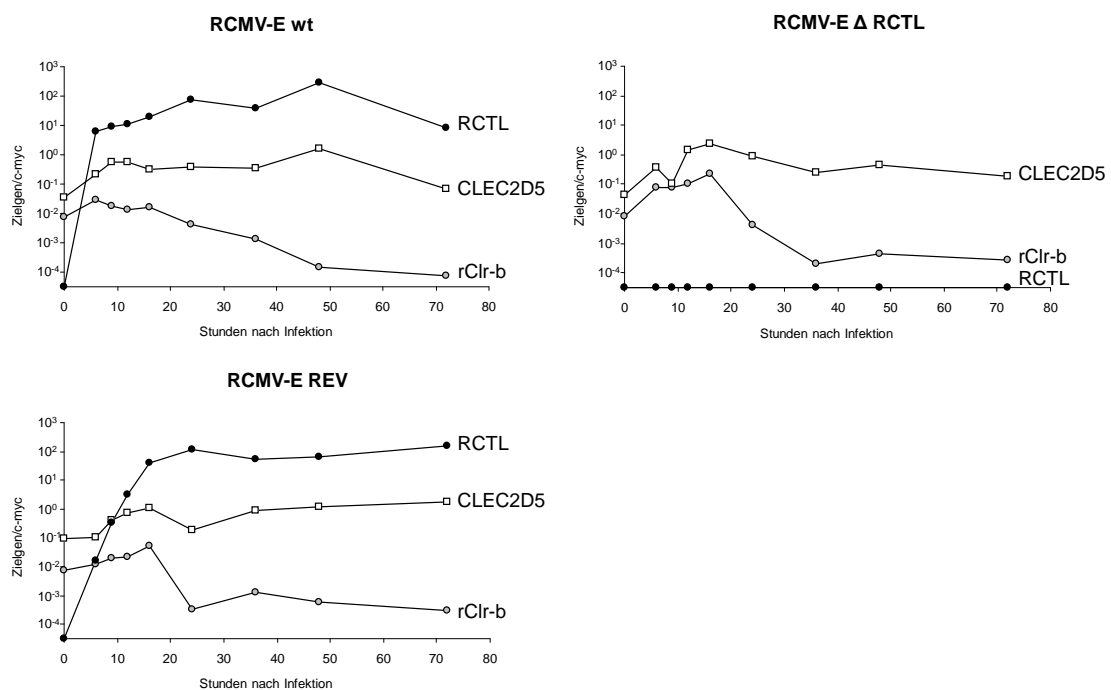


Abbildung 9: Quantitative Bestimmung der Expression von RCTL, rClr-b und dem Kontroll-Lektin CLEC2D5 nach Infektion von REFs mit den Viren RCMV-E wt, RCMV-E Δ RCTL und RCMV-E REV

Die isolierte RNS wurde unter Verwendung von MULV-RT in cDNS umgeschrieben, vermessen und wie unter 3.2.14 beschrieben in einer qPCR quantifiziert. In den Graphen ist die auf das Referenzgen c-myc normalisierte Expression über einen Zeitraum von 72 h nach Infektion aufgetragen. Messwerte unterhalb der Nachweisgrenze sind auf der X-Achse aufgetragen.

Bereits 6 h nach Infektion mit RCMV-E wt und REV erreicht die Expression von RCTL ein deutlich höheres Niveau als das endogene rClr-b. In allen drei Infektionsansätzen sinkt die Expression von rClr-b nach 24 h deutlich ab und bleibt auf einem Niveau knapp oberhalb der Nachweisgrenze, während die Transkription von CLEC2D5 nahezu unbeeinflusst bleibt.

FACS-Analysen bezüglich der Proteinexpression von RCTL und rClr-b zeigten eine rasche Depletion von rClr-b binnen 14 h und eine Oberflächenlokalisierung des

RCTLs 6 h nach Infektion (Voigt et al., 2007). Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde eine ubiquitäre Expression von rClr-b auf peripheren Blutzellen und ihren Vorläuferzellen im Knochenmark nachgewiesen, was die zentrale Bedeutung des Proteins in der Regulation der NK-Zell-Aktivität unterstreicht.

4.2.3 Klassifizierung von RCTL als Delayed Early-Gen

Wie eingangs erwähnt ist die Genexpression von Herpesviren kaskadenartig reguliert. Dementsprechend werden die Gene in die Gruppen *immediate early* (IE), *early* (E) und *late* (L) eingeteilt. IE-Gene werden sofort nach der Infektion exprimiert und benötigen keinerlei weitere Genprodukte oder Transkriptionsfaktoren. Early-Gene sind auf die IE-Proteine angewiesen, und ihre Transkription lässt sich durch die Zugabe von Cycloheximid (CHX), einem Inhibitor der ribosomalen Proteinsynthese, hemmen (Obrig et al., 1971). Die Expression der L-Gene ist zwingend an die Aktivität der viralen DNS-Polymerase gekoppelt, deren Aktivität sich durch die Gabe von Phosphonoessigsäure (PAA) inhibieren lässt (Reno et al., 1978). Die Transkription zellulärer Gene wird durch Zugabe dieser Chemikalien nicht beeinflusst.

Um zu bestimmen, ob es sich bei RCTL um ein IE- oder E-Gen handelt, wurden REFs mit RCMV-wt infiziert und unter gleichzeitiger Gabe von CHX bzw. PAA inkubiert. Nach 6 h (CHX), respektive 9 h (PAA), wurde die Gesamt-RNS präpariert und in einer auf *c-myc* normalisierten qPCR vermessen. Die Expression der beiden Wirtsgene *CLEC2D5* und *rClr-b* wurde wie erwartet durch keine der beiden Chemikalien inhibiert (Abbildung 10 A & B). Die Transkription RCTL-spezifischer mRNS hingegen wurde in Anwesenheit von CHX fast vollständig gehemmt, während die alleinige Zugabe von PAA keinerlei Einfluss hatte (Abbildung 10 A). Aufgrund dieser Hemmung ist RCTL eindeutig als Delayed Early-Gen einzustufen.

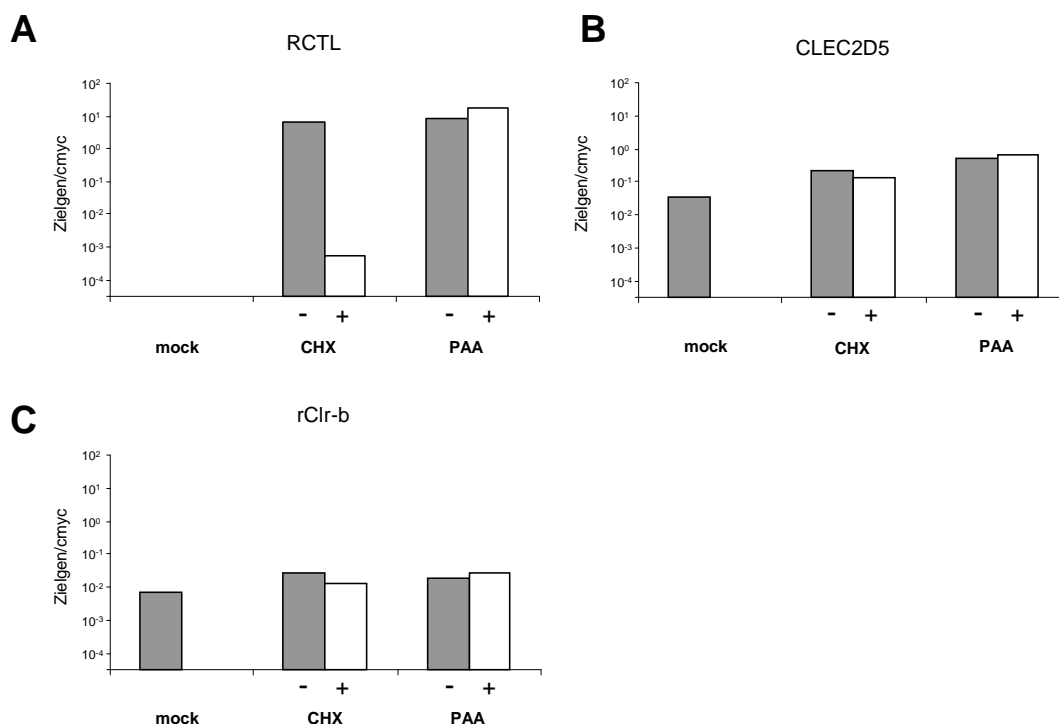


Abbildung 10: Eingruppierung von RCTL als Early-Gen.

REFs wurden in Ab- und Anwesenheit von Cycloheximid (CHX) oder Phosphonoessigsäure (PAA) mit RCMV-E wt infiziert. 6 h (CHX) bzw. 9 h (PAA) nach Infektion wurde Gesamt-RNS präpariert und die Expression der Gene *RCTL* (A), *CLEC2D5* (B) und *rClr-b* (C), normalisiert auf das Referenzgen *c-myc* gemessen. Mock repräsentiert einen nicht infizierten Kontrollansatz und -/+ steht für die Zugabe der jeweiligen Chemikalie im Infektionsansatz.

4.2.4 Bedeutung von RCTL für die *in vivo* Infektion

Phylogenetische Analysen zeigten eine Diversität in den möglichen NKR-P1-Rezeptoren verschiedener Ratten-Laborstämme, während die dazugehörigen Liganden kaum Unterschiede aufwiesen (Voigt et al., 2007). Aus diesem Grund wurden Bindungsstudien mit RCTL und den NKR-P1-Rezeptoren verschiedener Rattenstämme durchgeführt. Es zeigte sich, dass RCTL eine hohe Affinität zu NKRP1-B des Rattenstammes WAG aufweist und deutlich schwächer an die Rezeptoren NKR-P1A und NKR-P1B der SD-Ratten bindet (Voigt et al., 2007). NKR-P1B ist der natürliche inhibitorische Rezeptor von rClr-b, während NKR-P1A nach Ligandenbindung die NK-Zell-vermittelte Lyse stimuliert. Würde RCTL die inhibitorische Funktion des rClr-b ersetzen, sollte dies in WAG-Tieren deutlich zu erkennen sein. Die schwächere und parallele Bindung an den stimulierenden Rezeptor würde diesen Effekt in SD-Ratten mildern oder gänzlich aufheben. Deshalb wurden die Infektionsversuche mit Tieren dieser beiden Stämme durchgeführt.

Zur Gewährleistung einer ausreichenden und vergleichbaren Infektion wurde die Infektionsdosis durch Rücktitration der Injektionsverdünnung bestätigt. Die bisherigen Untersuchungen deuteten darauf hin, dass RCTL als funktionelles Homolog des Wirtsproteins rClr-b fungiert. Die Ergebnisse der Rezeptorbindungsstudie ließen jedoch vermuten, dass die Wirkung stammspezifisch variieren könnte. Demzufolge wurden für die *in vivo* Studie die beiden Rattenstämme WAG und SD ausgewählt. Sollte RCTL, wie zu diesem Zeitpunkt postuliert, rClr-b ersetzen und die infizierten Zellen vor NK-Zell-mediierter Zerstörung schützen, sollte der Virustiter in mit RCMV-E Δ RCTL infizierten Tieren niedriger als in RCMV-E wt und RCMV-E REV infizierten Tieren sein. Eine Depletion der NK-Zellen hingegen sollte in der Lage sein, den Verlust von RCTL zumindest in Teilen zu kompensieren.

Am Tag 3 nach Infektion wurden die Tiere getötet und die Viruslast in Milz und Leber durch *Plaque Assay* bestimmt. In WAG-Ratten wurden in Anwesenheit der NK-Zellen (UND) in RCMV-E wt und RCMV-E REV infizierten Tieren nahezu identische Titer gemessen, während die Viruslast in den Organen der mit Δ RCTL infizierten Tiere unterhalb der Nachweisgrenze von 1×10^2 pfu/Organ bzw. pfu/g lag (Abbildung 11 A). Die antikörpervermittelte Depletion der NK-Zellen (NKD) hatte in RCMV-E wt und RCMV-E REV infizierten Tieren keinen Einfluss auf die ermittelten Titer. Bei den mit dem RCMV-E Δ RCTL infizierten Tieren stieg der Titer etwa auf das gleiche Niveau wie in den Organen der anderen Versuchstiergruppen. Um auszuschließen, dass der beobachtete Titerverlust die Folge einer ausgebliebenen Infektion war, wurden in allen Organproben mittels qPCR die Genomäquivalente bestimmt und auf das Wirtsgen *c-myc* normalisiert (Abbildung 11 B). In sämtlichen Organproben der mit RCMV-E Δ RCTL infizierten Tiere, deren NK-Zellen depletiert wurden, konnte RCMV-DNS nachgewiesen werden. Die in allen anderen Proben gemessenen relativen Kopienzahlen waren erwartungsgemäß deutlich höher, unterschieden sich untereinander jedoch nicht signifikant und bestätigten somit die Resultate der *Plaque Assays*.

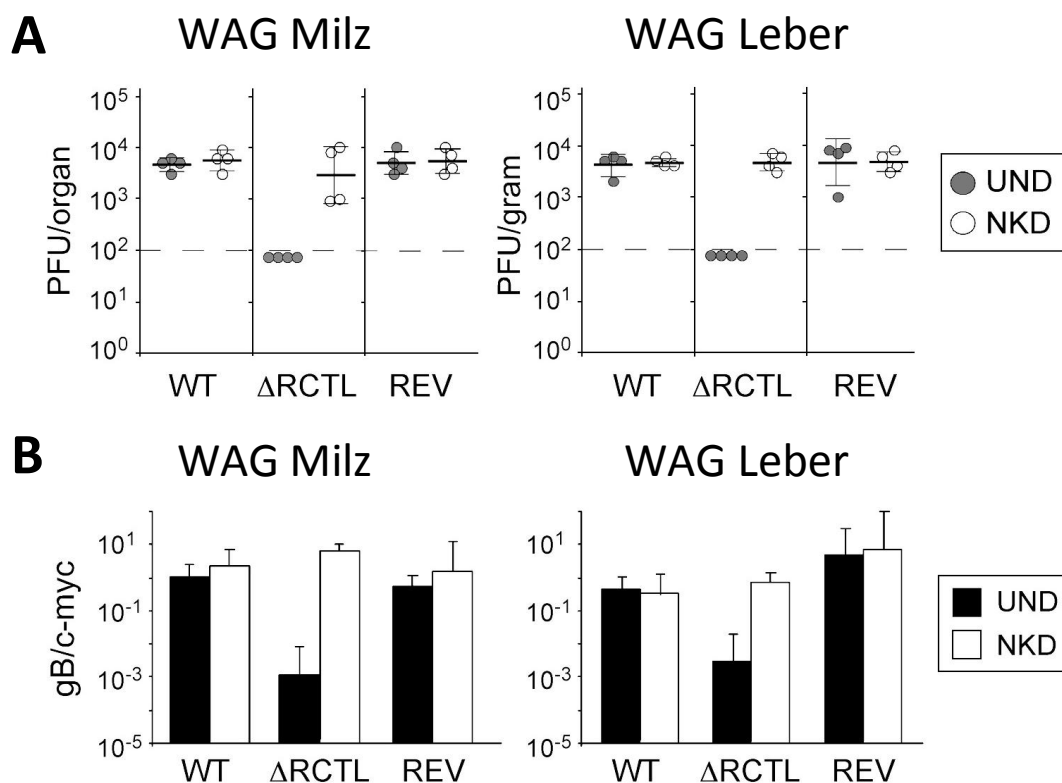


Abbildung 11: Titerbestimmung der WAG Ratten mittels Plaque-Assay und qPCR

A Virustiter (PFU) in Milz und Leber der WAG-Ratten 3 Tage nach Infektion mit den Viren RCMV-E wt, RCMV-E Δ RCTL und RCMV-E REV. Titer sind in einer Log_{10} -Skalierung aufgetragen. Die Standardabweichung ist um das geometrische Mittel (-) aufgetragen. Die gestrichelte Linie gibt die Nachweisgrenze des Plaque-Assays an. In grau sind die Tiere mit NK-Zellen (UND) und in weiß die Tiere, bei denen die NK-Zellen depletiert wurden (NKD), dargestellt. Die Titer der mit RCMV-E Δ RCTL infizierten Tiere und derjenigen, deren NK-Zellen depletiert wurden, unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) von allen anderen Tiergruppen.

B Die Viruslast wurde parallel in denselben Organen mittels Taqman-PCR bestimmt und die viralen Genomkopien mittels des Wirtsgens *c-myc* normalisiert. Die dargestellte Viruslast wurde aus dem Mittelwert aller Tiere der jeweiligen Gruppe gebildet und mit der Standardabweichung auf einer Log_{10} -Skala aufgetragen. Mit Ausnahme der RCMV-E wt infizierten Tiere, deren NK-Zellen nicht depletiert wurden (UND) ($p > 0,05$) unterscheiden sich die Titer der mit RCMV-E Δ RCTL infizierten NKD-Tiere signifikant ($p < 0,05$) von den anderen Tiergruppen.

Die *in vivo* Studien zeigen deutlich, dass RCTL in WAG-Ratten essentiell für die Etablierung einer Infektion ist und der Verlust dieses Gens durch die Depletion der NK-Zellen kompensiert wird.

Zeitgleich mit dem eben beschriebenen Infektionsversuch wurden unter identischen Bedingungen und gleicher Gruppenzusammenstellungen auch SD-Ratten infiziert und die Viruslast in den Organen mittels Plaque-Assay und qPCR untersucht. Interessanterweise ist der mittlere Organtiter auch ohne die Depletion der NK-Zellen bei allen drei injizierten Viren identisch. Die bestimmten Virustiter sind jedoch signifikant niedriger als in den Organen der WAG-Tiere. Die

NK-Zell-Depletion bewirkt in SD-Ratten einen Anstieg des mittleren Organtiters um ca. das Zehnfache, was in etwa dem zuvor in den WAG-Ratten bestimmten mittleren Titer entspricht. Auch diese Ergebnisse konnten in qPCR-Assays bestätigt werden.

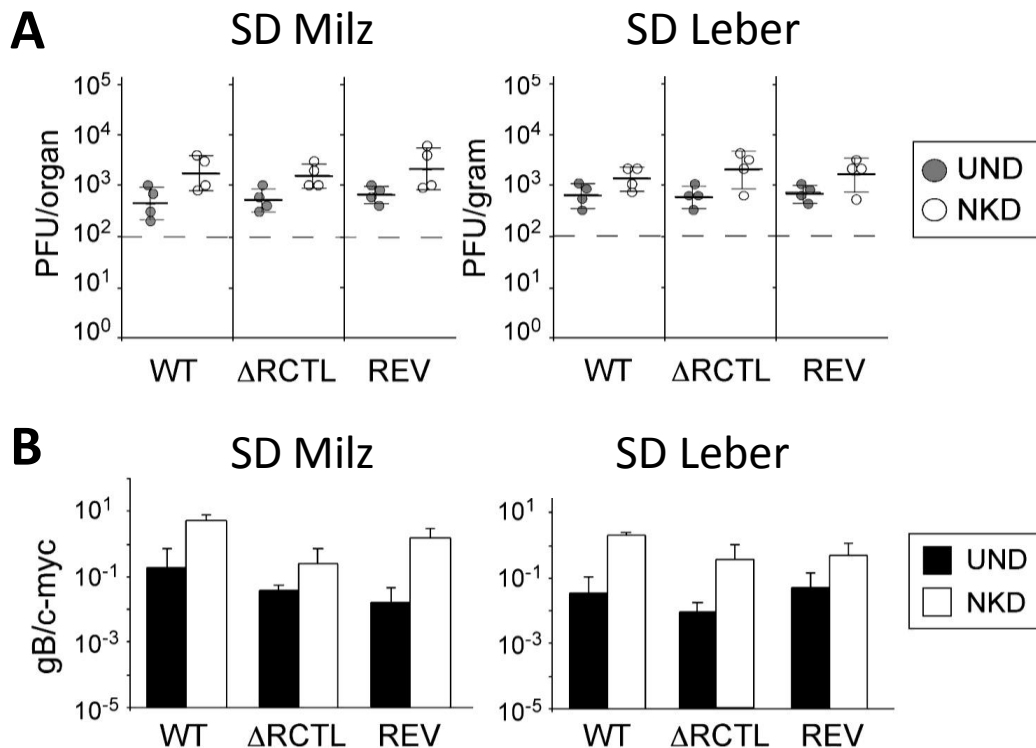


Abbildung 12: Titerbestimmung der SD-Ratten mittels Plaque-Assay und qPCR

A Virustiter (PFU) in Milz und Leber der SD-Ratten 3 Tage nach Infektion mit RCMV-E wt, RCMV-E ΔRCTL und RCMV-E REV. Titer sind in einer Log_{10} -Skalierung aufgetragen. Die Standardabweichung ist um das geometrische Mittel (-) aufgetragen. Die gestrichelte Linie gibt die Nachweisgrenze des Plaque-Assays an. In grau sind die Tiere mit NK-Zellen (UND) und in weiß die Tiere, bei denen die NK-Zellen depletiert wurden (NKD), dargestellt. Die Titer der RCMV-E ΔRCTL infizierten, NK-Zell-depletierten Tiere unterscheidet sich nicht signifikant ($p < 0,05$) von den anderen Tiergruppen.

B Die Viruslast wurde parallel in denselben Organen mittels Taqman-PCR bestimmt und die viralen Genomkopien mittels des Wirtsgens *c-myc* normalisiert. Die dargestellte Viruslast wurde aus dem Mittelwert aller Tiere der jeweiligen Gruppe gebildet und mit der Standardabweichung auf einer Log_{10} -Skala aufgetragen. Der Titer der mit RCMV-E ΔRCTL infizierten Tiere ohne NK-Zell Depletion (UND) unterscheidet sich signifikant ($p < 0,05$) von den Titern der Tiergruppen RCMV-E wt und RCMV-E REV Tieren, deren NK-Zellen depletiert wurden (NKD), jedoch nicht von denen der mit RCMV-E ΔRCTL infizierten NKD-Tiere.

Wie bereits angenommen zeigen diese Ergebnisse, dass der Einfluss von RCTL auf das Infektionsgeschehen stammspezifisch ist und die Divergenz in den NKR-P1-Allelen die Wirkung pathogen-assoziiertes Evasionsmechanismen beeinflussen kann. Da der Verlust von RCTL in SD-Ratten die Etablierung einer Infektion nicht beeinträchtigt, ist davon auszugehen, dass im Genom weitere Gene vorhanden sind, die die Aktivität von NK-Zellen inhibieren.

4.3 Reparatur des defekten RCMV-E Δ BAC

Die Klonierung der RCMV-E als infektiöses BAC sollte die zukünftige Mutagenese des RCMV-E deutlich erleichtern. Der Transfer des viralen Genoms in *E.coli* bringt zahlreiche Vorteile mit sich. 1. In *E.coli* stehen schnelle, hocheffiziente und gut kontrollierbare Rekombinationssysteme zur Verfügung. 2. Es handelt sich bei BACs um Vektoren, die nur als Einzelkopie in den Bakterien vermehrt werden. Durch einfache Plattierungstechniken kann somit schon zu Beginn der Mutagenese klonal gearbeitet werden. 3. Durch die Entkoppelung der DNS-Replikation vom viralen Infektionszyklus können auch essentielle Gene mutiert werden.

Zu Beginn dieser Arbeit existierte bereits ein BAC des RCMV-E. Dabei war eine pHA2-BAC-Kassette an Position 175.436 des RCMV-E Genoms eingefügt worden. Das aus diesem rekonstituierte Virus enthielt zwischen den Leserahmen e152 und e153.1 die BAC-Kassette (Abbildung 13 B). Im Rahmen dieser Rekombination trat jedoch eine 7,7 kBp-Deletion auf. Durch Sequenzierung konnte die genaue Position dieser Deletion zwischen Positionen 154.863 und 162.593 ermittelt werden (Abbildung 13 A). Diese Deletion hatte den Verlust der nicht essentiellen Gene ECK bis e138 und die C-terminale Trunkierung der Gene e128 und e139 zur Folge. Dieses Virus wird im folgenden als RCMV-E Δ BAC bezeichnet.

Für *in vivo* Experimente muss die zuvor eingebaute Fremd-DNS wieder aus dem viralen Genom entfernt werden, um auszuschließen, dass die von der BAC-Kassette kodierten Gene einen Einfluss auf den Infektionszyklus haben. Die Exzision wird über die an beiden Seiten flankierenden LoxP-Motive ermöglicht.

Durch Expression der CRE-Recombinase in mit dem RCMV-E BAC transfizierten REFs wurde die BAC-Kassette wieder entfernt. Es blieb nur ein von zwei PacI-Restriktionsschnittstellen flankiertes LoxP-Motiv zurück (Abbildung 13 C). Die so generierten Viren waren mit Ausnahme des LoxP-Motivs genetisch identisch mit dem RCMV-E wt. In den folgenden Experimenten werden diese Viren als RCMV-E CRE bezeichnet.

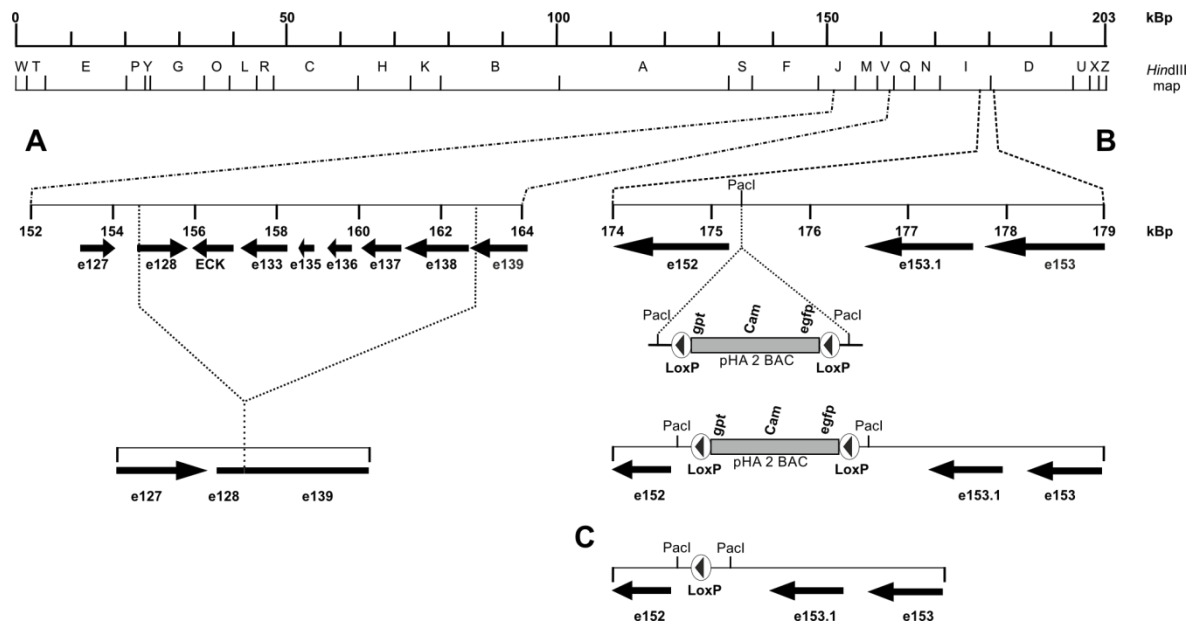


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Klonierung der BAC-Kassette in das RCMV-E Genom

Oben befinden sich ein Positionmaßstab des RCMV-E Genoms mit einer *HindIII*-Restriktionskarte. **A** Im Zuge der Insertion der pHA2 BAC-Kassette wurden die Leserahmen der Gene e128 bis e139 teilweise oder vollständig deletiert. **B** Die BAC-Kassette wurde ohne Unterbrechung viraler Gene zwischen e152 und e153.1 eingesetzt. **C** Nach Exzision der BAC-Kassette bleibt nur ein LoxP-Motiv in den RCMV-E CRE Viren zurück.

4.3.1 Reinsertion des deletierten Genomabschnitts und Plaquemorphologie

Durch Restriktionsverdau von Virion-DNS mit *NheI* konnte ein 10,6 kBp Fragment isoliert und in den Transfer-Vektor *pst76KSR* kloniert werden. In diesem Fragment ist die im RCMV Δ BAC deletierte Region von zwei 1,3 kBp umfassenden, nicht deletierten Bereichen flankiert. Über diese homologen Bereiche erfolgte die *RecA*-vermittelte Rekombination in *E.coli* (für eine ausführliche Beschreibung siehe 3.2.4). Um das Risiko möglicher Nebenmutationen möglichst gering zu halten, wurde die Reinsertion in drei unabhängigen Ansätzen durchgeführt und die Korrektheit mittels Restriktionsverdau bestätigt. Aus jedem dieser Ansätze wurde RCMV-E BAC ausgewählt und für die nachfolgenden Untersuchungen verwendet. Diese Viren werden im Folgenden als RCMV-E BAC 1 bis 3 bezeichnet.

Die Rekonstitution der Viren aus den BAC-Konstrukten erfolgte wie unter 3.3.6 beschrieben durch Transfektion von REF-Zellen. Die folgenden Experimente wurden alle mit diesen rekonstituierten Viren durchgeführt.

Nach Infektion von REFs mit dem RCMV-E Δ BAC zeigen diese eine deutlich veränderte Zell- und Plaquemorphologie in Form von Syncytienbildung (Abbildung 14 B). Zellen, die entweder mit RCMV-E wt (A), RCMV-E BAC (C) oder RCMV-E CRE infiziert wurden, zeigen eine übereinstimmende Morphologie der

Zellen und Plaques. Da die mit den Viren RCMV-E BAC 2 und 3 infizierten Zellen sich hinsichtlich Zell- und Plaquemorphologie nicht von den mit RCMV-E BAC 1 infizierten Zellen unterscheiden, wird auf eine gesonderte Darstellung verzichtet.

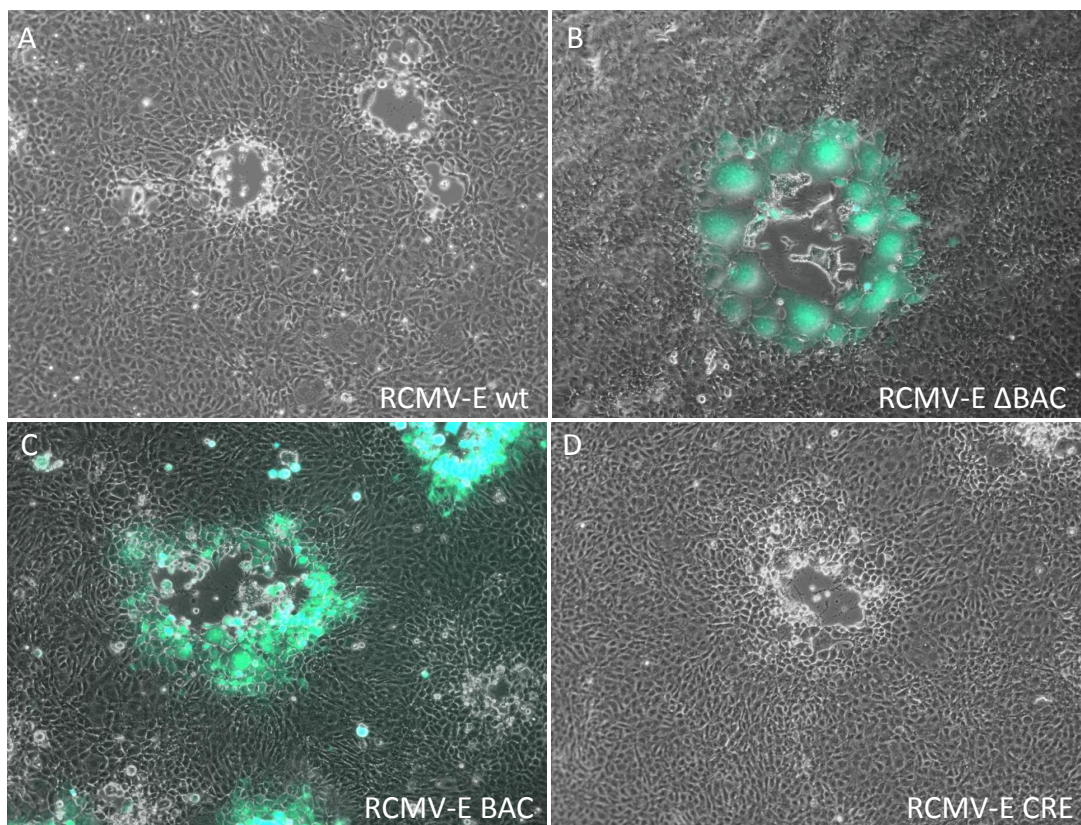


Abbildung 14: Plaquemorphologie unterschiedlicher RCMV-E Varianten

REFs wurden mit einer moi von 0,1 mit den Viren RCMV-E wt (A), RCMV-E Δ BAC (B), RCMV-E BAC (C) und RCMV-E CRE (D) infiziert und nach 48 h bei 100-facher Vergrößerung im Durchlicht bzw. unter Fluoreszenzlicht, mit einem entsprechenden Filter fotografiert. Beide Aufnahmen wurden übereinander gelegt, um die infizierten Zellen deutlich zu kennzeichnen.

4.3.2 Wachstumskinetik des RCMV-E BAC

Viren, die eine BAC-Kassette enthalten, zeigen nicht selten ein verzögertes Wachstumsverhalten und erreichen auch geringere Maximaltitere. Dies ist mitunter auf die zusätzliche Fremd-DNS zurückzuführen. Die Expression der Cre-Rekombinase nach Transfektion von REFs mit den RCMV-E BAC Plasmiden vermittelt die Exzision der BAC-Kassette aus dem viralen Genom. Dadurch entsteht ein Virus, welches mit Ausnahme eines verbleibenden LoxP-Motivs mit dem Wildtyp-Virus identisch ist. Diese RCMV-E CRE Viren sollten sich bezüglich der Wachstumskinetik von den Wildtypviren unterscheiden.

In den Ansätzen mit einer hohen Infektionsdosis (moi=3) (Abbildung 15 A & C) werden statistisch alle Zellen bei Zugabe der Viren infiziert, und eine Infektion

durch neu gebildete Viren spielt für die Ausbreitung der Infektion eine geringere Rolle. Bei niedriger Infektionsdosis ($\text{moi}=0,01$) (Abbildung 15 B & D) hingegen werden nur etwa 1 % der ausgesäten Zellen zu Beginn infiziert. Benachbarte Zellen werden erst durch die neugebildeten Viren infiziert. Die Dauer des Replikationszykluses und die Anzahl der gebildeten infektiösen Partikel je Zelle haben hier einen deutlich stärkeren Einfluss.

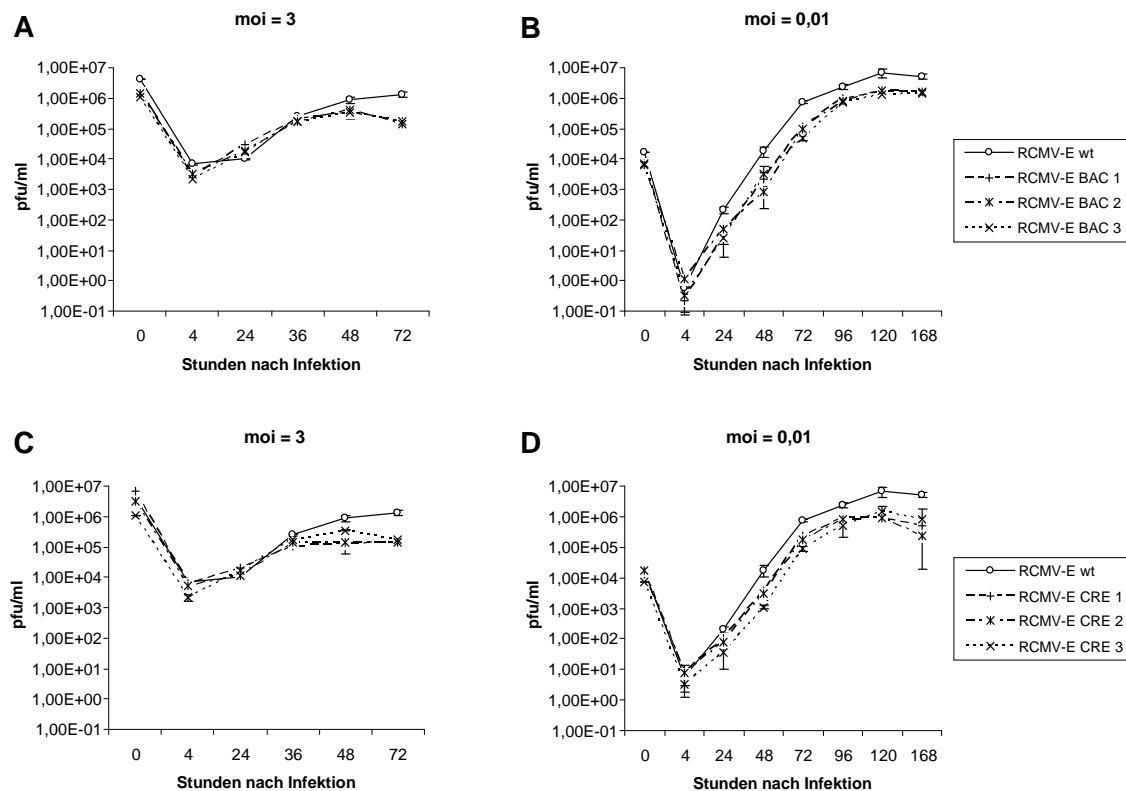


Abbildung 15: Wachstumskurven der Viren RCMV-E wt, RCMV-E BAC und RCMV-E CRE im Vergleich

REFs wurden mit einer hohen ($\text{moi}=3$; A; C), bzw. niedrigen ($\text{moi}=0,01$; B; D) Infektionsdosis infiziert und die Viruslast nach den angegebenen Zeitpunkten durch Plaque-Assay Titration bestimmt. Die Viren BAC 1, BAC 2 und BAC 3 enthalten die BAC-Kassette und wurden in unabhängigen Rekombinationen gewonnen. Bei den Viren CRE 1, CRE 2 und CRE 3 wurde die BAC-Kassette mit Hilfe der Cre-Rekombinase entfernt.

Sowohl die Viren, die noch die BAC-Kassette tragen, als auch jene, in denen diese wieder entfernt wurde, erreichen niedrigere Endtiter als das wt-Virus. Bei einer hohen Infektionsdosis ist in den Ansätzen des RCMV-E wt auch nach 36 h noch ein konstanter Anstieg des Titers zu beobachten, während dieser sich in den Ansätzen der RCMV-E BAC Viren deutlich abschwächt. Die CRE-Viren mit Ausnahme von CRE 1 erreichen bereits nach 36 h den Endtiter. Eine niedrige Infektionsdosis resultiert sowohl bei den BAC- als auch den CRE-Viren, verglichen mit RCMV-E wt, schon nach 24 h in einer deutlichen Verzögerung der

Virusproliferation. Bei der mikroskopischen Beurteilung der Zellvitalität zu jedem Meßzeitpunkte wurde deutlich, dass sich in den nicht mit RCMV-E wt infizierten Ansätzen die Zellen wesentlich eher vom Boden ablösten. Dies deutet auf einen beschleunigten Tod der infizierten Zellen hin. Da Cytomegaloviren sich nicht nur lytisch, sondern auch die Ausschleusung neugebildeter Viren aus der lebenden Zelle vermehren, führt ein beschleunigter Zelltod auch zu einer geringeren Zahl an Nachkommenviren je infizierter Zelle.

5 Diskussion

5.1 RCMV-E repräsentiert eine eigene Virusspezies innerhalb der *β-Herpesvirinae*

Die beiden Isolate des Ratten-Cytomegalovirus RCMV-M und RCMV-E unterscheiden sich bezüglich ihrer Genomgröße und ihres Restriktionsmusters (Burns et al., 1988). Sequenzvergleiche basierend auf den partiell publizierten Sequenzen des RCMV-E mit dem vollständig sequenzierten RCMV-M Genom, führten zu der Annahme, dass es sich bei RCMV-E nicht um eine Subspezies des RCMV-M, sondern eine eigene Virusspezies handelt (Beisser et al., 1998; Burns et al., 1988; Casarosa et al., 2003; Vink et al., 2000; Voigt et al., 2005).

5.1.1 Vergleich des RCMV-E Genoms mit MCMV und RCMV-M

Die vollständige Sequenzierung des RCMV-E Genoms und dessen Analyse ergab deutliche Unterschiede zu vergleichbaren CMVs. Mit einer Genomgröße von nur 2,3 kBp ist RCMV-E ca. 30 kBp kleiner als jene von RCMV-M, MCMV und HCMV. Wie auch RCMV-M und MCMV verfügt RCMV-E über ein Klasse F Genom (Rawlinson et al., 1996; Vink et al., 2000). Der G+C-Gehalt des RCMV-E Genoms liegt bei 40,3 % und ist bis auf die terminalen Bereiche gleichmäßig über das Genom verteilt. Er liegt damit ca. 20 % niedriger als bei MCMV und RCMV-M. Ob die Reduzierung des G+C-Gehalts von Vorteil für die virale Replikation ist bleibt noch unklar. Durch den reduzierten G+C-Gehalt wird auch die Anzahl der CpG-Motive reduziert. Wie eingangs erwähnt werden diese durch TLR9 erkannt und so die Interferon-Antwort induziert (Tabeta et al., 2004). Eine Verringerung dieser CpG-Motive ginge somit mit einer Schwächung bzw. Verzögerung der TLR9-vermittelten Interferon-Antwort einher. Folglich wären auch die nachgeschaltete Cytokinsekretion und Rekrutierung von Immunzellen an den Infektionsort geschwächt. Khrotaslev et al. zeigten mittels *in silico* Analysen, dass virale und bakterielle Proteine, die von Genen mit reduzierten G+C-Gehalt kodiert wurden signifikant kürzere und weniger putative B-Zell-Epitope aufwiesen (Khrotaslev & Barkovsky, 2011). Somit wäre auch die humorale Immunantwort gegen RCMV-E geschwächt. Beide Arbeiten sprechen dafür, dass die Reduzierung des G+C-Gehalts zu einer verminderten Immunantwort und folglich einer effizienteren Virusreplikation führt.

Schätzungen gehen davon aus, dass CMVs mehr als 200 Gene kodieren (Pellett & Roizman, 2006). Die Gene der Virusreplikation und der Strukturproteine sind in allen Herpesviren konserviert und bilden den sogenannten Kern (Davison et al., 2003). Die restlichen Gene, insbesondere diejenigen die der Immunevasion dienen, variieren teilweise stark zwischen den Virusspezies und sind größtenteils im Bereich der Genomenden lokalisiert.

In RCMV-E konnten insgesamt 139 ORFs identifiziert werden, in etwa 30 weniger als für RCMV-M oder MCMV beschrieben sind. Durch die reduzierte Genomgröße sinkt auch die Kodierungskapazität und erklärt zum Teil auch die reduzierte Zahl an ORFs. Die vier Leserahmen e113, e124, ORF6 und ORF16 wurden im Genom annotiert, obwohl sie nicht die zuvor festgelegten Kriterien erfüllten. Weder e113 noch e124 verfügen über ein ATG als Start-Codon, jedoch wiesen diese Leserahmen eine hohe Sequenzidentität zu den beiden MCMV-Leserahmen m113 und m124 auf. Die Funktion des e113-Homologs m113 ist bislang noch nicht geklärt. Möglicherweise handelt es sich dabei um ein alternatives terminales Exon einer Spleißvariante des Gens m112 (Bühler, et al., 1990; Rawlinson et al., 1996). Der ORF e124 zeigt deutliche Ähnlichkeit zum C-terminalen Bereich des m124. Es konnten in der Umgebung zu e124 keine weiteren Exons und Spleißstellen identifiziert werden, die als potentieller N-Terminus des kodierten Proteins fungieren könnten. Anhand von MCMV-Deletionsmutanten konnte gezeigt werden, dass m124 nicht essentiell für die Virusreplikation ist. Das Gen ist in der sogenannten *Enhancer*-Region lokalisiert, die für eine effiziente Expression der IE-Gene notwendig ist (Angulo et al., 1998). Welche Konsequenzen die Trunkierung von e124 auf die Replikation von RCMV-E hat wurde noch nicht untersucht. ORF6 erfüllte mit nur 237 Nukleotiden nicht die geforderte Mindestlänge von 300 Nukleotiden. Die Positionshomologie zu m119.4 aus MCMV suggeriert, dass es sich möglicherweise bei ORF6 um einen Leserahmen handelt, der mit e119.1 und e119.2 zusammengefasst werden kann. Der schlechte prädiktive Wert von 0,4 führte jedoch dazu, diesen Leserahmen nicht als e119.4, sondern als putativen ORF6 zu benennen. ORF16 erfüllte mit einer Länge von 201 Nukleotiden und einer e-value von 0,009 nicht die Einschlusskriterien für die Annotation als RCMV-E Leserahmen. Da es sich bei dem potentiellen Homolog um das Glykoprotein gp007 (Acc.-No.: NP_050182) des humanen Herpesvirus 6 (HHV6)

handelte, wurde es dennoch aufgenommen. Ob diese vier Leserahmen tatsächlich translatiert werden, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

Es ist zu vermuten, dass durch diese theoretische Analyse nicht alle Leserahmen identifiziert wurden und auch in Zukunft weitere Gene in RCMV-E gefunden werden. Dies betrifft insbesondere auf alternative Spleißprodukte, Gene die wie RCTL nicht mit einem ATG als Start-Codon beginnen oder ORFs die innerhalb anderer Leserahmen kodiert sind. Das Tupaia-Herpesvirus (THV) gehört ebenfalls zu den Cytomegaloviren und verfügt mit 196 kBp über ein noch kleineres Genom als RCMV-E. Bislang wurden bei THV unter Anwendung ähnlicher Kriterien, wie sie zur Annotation des RCMV-E Genoms verwendet wurden, bereits 158 putative Leserahmen identifiziert (Bahr & Darai, 2001). Die wohl effizienteste Methode zur Identifizierung sämtlicher im RCMV-E Genom kodierten Leserahmen wäre eine vollständige Transkriptomanalyse mittels *ultra deep sequencing*.

Von den 139 in RCMV-E identifizierten Proteinen verfügen 118 über Homologe in RCMV-M und MCMV (siehe Tabelle 32). Von diesen 118 Proteinen zeigen 69 im direkten Sequenzvergleich eine höhere Übereinstimmung zu den Homologen aus MCMV. Dies deutet darauf hin, dass RCMV-E einen höheren Verwandtschaftsgrad zu MCMV als zu RCMV-M aufweist.

Für den Vergleich der funktionellen Gruppen wurde davon ausgegangen, dass die in RCMV-E kodierten Genprodukte die gleiche Funktion wie ihre Homologe in MCMV und RCMV-M erfüllen. Innerhalb der funktionellen Gruppen wiesen alle Proteine in RCMV-E eine höhere Sequenzidentität zu Homologen aus MCMV auf. Auch bei den fünf in RCMV-E identifizierten Genfamilien wurde in den meisten Fällen eine höhere Sequenzidentität zwischen den RCMV-E Proteinen und den MCMV-Homologen gefunden.

Die größte Diversität zwischen den drei Virusgenomen findet sich an den Enden (siehe Abbildung 6). Der linke Terminus, an dem die Viren einen Großteil der Gene kodieren die keine Homologe in anderen CMVs aufweisen, ist bei MCMV mit ca. 20 kBp am größten und beinhaltet die m02-Familie (Rawlinson et al., 1996). In beiden RCMV überspannt dieser Bereich lediglich 10 kBp und enthält keine Homologe zu Proteinen der m02-Familie. Diese Genfamilie wurde bislang ausschließlich in MCMV beschrieben und beinhaltet die Proteine m02 bis m16 (Rawlinson et al., 1996). Mutanten, bei denen entweder einzelne oder sämtliche in

dieser Region kodierten Proteine deletiert wurden, zeigten *in vitro* keine Wachstumsdefizite. Wurden Mäuse mit diesen Deletionsmutanten infiziert konnte eine erhöhte Aktivität und Proliferation von NK-Zellen beobachtet werden (Oliveira et al., 2002). Die Abwesenheit dieser Proteinfamilie in beiden RCMVs deutet darauf hin, dass MCMV diese Proteine als spezielle Anpassung an das murine Immunsystem erworben hat, oder aber andere in den RCMVs kodierten Proteine, die keine Ähnlichkeit zur m02-Familie aufweisen, übernehmen diese Funktion.

Am rechten Terminus kodieren alle drei CMVs für die Gene der m145-Familie. RCMV-E kodiert lediglich sieben Homologe zu Mitgliedern dieser Proteinfamilie. MCMV und RCMV-M hingegen verfügen im rechten terminalen Genombereich über jeweils zehn Proteine, die der m145-Familie zugeordnet werden können. RCMV-M kodiert darüber hinaus noch für vier zusätzliche m145-Homologe (r70.2 bis r70.5) im zentralen Bereich des Genoms. Für verschiedene Mitglieder der m145-Familie (m145, m152 und m155) wurde ebenfalls gezeigt, dass sie die NK-Zell-Aktivität hemmen. All diese Proteine sind an der Oberfläche lokalisierte Liganden der NKG2D-Rezeptoren und inhibieren durch direkte Interaktion die NK-Zell-Aktivität (Krmptotic et al., 2005; Powers, DeFilippis et al., 2008). RCMV-E hingegen verfügt nur über sieben Homologe der m145-Familie (siehe 4.1.2). Es ist vorstellbar, dass die in RCMV-E kodierten Proteine der m145-Familie ein breiteres Spektrum an NK-Rezeptoren binden können und so die Funktionen der fehlenden Proteine übernehmen. Darüber hinaus kodiert RCMV-E für RCTL, das ebenfalls an der Inhibition von NK-Zellen beteiligt ist. Desweiteren könnten einige putativen Leserahmen ORF1 - ORF19 Proteine kodieren, die an NK-Modulation beteiligt sind.

Wie in Abbildung 6 dargestellt kodieren RCMV-M und MCMV in den Genabschnitten zwischen den Leserahmen 105 und 135 zahlreiche Proteine, zu denen keine Homologe in RCMV-E identifiziert werden konnten. Bislang ist in keinem der Viren die Funktion dieser Proteine untersucht, sodass über deren Bedeutung im Infektionsgeschehen keine Aussage getroffen werden kann. Das Fehlen dieser Proteine in RCMV-E legt jedoch die Vermutung nahe, dass sie für die Virusreplikation eine eher untergeordnete Rolle spielen und im Sinne der Genomkondensation entfernt wurden.

Eine Besonderheit des RCMV-E ist, dass es für Proteine kodiert, die bislang für andere CMVs nicht beschrieben wurden. Mit e127 verfügt RCMV-E über das einzige bislang für CMV beschriebene virale CD200-Homolog. Bislang konnte die Bindung von e127 an den zellulären CD200-Rezeptor (CD200R) gezeigt werden (Foster-Cuevas et al., 2011). CD200-Orthologe humaner Herpesviren binden ebenfalls an den CD200R (Foster-Cuevas et al., 2004; Shiratori et al., 2005). Aufgrund der Sequenzidentität zum endogenen CD200 der Ratte wird vermutet, dass es die Aktivität von Makrophagen im infizierten Gewebe hemmt. Infektionsversuche mit einer e127-Deletionsmutante konnten dies jedoch nicht bestätigen, sodass die Funktion im viralen Infektionszyklus noch nicht klar definiert werden konnte (Foster-Cuevas et al., 2011).

Darüber hinaus enthält RCMV-E noch zwei C-Typ-Lektin-ähnliche Gene, RCTL und RCTL2. Während RCTL am Anfang des Genoms kodiert wird befindet sich der Leserahmen von RCTL2 am Ende. Auch RCMV-M kodiert im Leserahmen r153 für ein solches Gen (Brocchieri et al., 2005). Auffällig ist dabei, dass es sich bei RCTL2 und r153 um Positionshomologe handelt, jedoch auf Aminosäureebene eine höhere Sequenzidentität zwischen RCTL und r153 existiert. Auf die detaillierten Vergleiche dieser drei Proteine wird unter 5.2 gesondert eingegangen.

5.1.2 Verwandtschaft von RCMV-E zu anderen Cytomegaloviren

Schon bei der Erstbeschreibung des RCMV-E wurde vermutet, dass es sich bei den RCMV-Isolaten Maastricht und England um zwei unterschiedliche Virus-spezies handelt (Burns et al., 1988). In den folgenden Jahren wurden partiell Sequenzen des RCMV-E publiziert, mit RCMV-M verglichen und diese Annahme damit untermauert (Beisser et al., 1998; Teterina et al., 2009; Voigt et al., 2005). Infektionsstudien zeigten zudem, dass sich RCMV-E in Bezug auf Zellzyklusarrest und Persistenz nicht von anderen CMVs unterscheidet (Neuwirth, 2005; Sandford et al., 2010). Die analoge Anordnung der Gene und die ausgeprägte Homologie zu ORFs in MCMV und RCMV-M erlauben eine eindeutige Zuordnung von RCMV-E in das Genus der Muromegaloviren innerhalb der Cytomegaloviren.

Sequenzübereinstimmung mit MCMV und RCMV-M

Die Sequenzidentität der translatierten RCMV-E ORF zu jenen in MCMV und RCMV-M schwankt zwischen 11 und 86 % bzw. 13 % und 84 % und entspricht dem Schwankungsintervall zwischen RCMV-M und MCMV (10 % bis 85 %). In der Summe zeigen 49 % aller annotierten ORFs eine maximale Sequenzidentität zu Leserahmen im MCMV-Genom und nur 20 % zu den Leserahmen von RCMV-M. Würde es sich bei den beiden RCMV-Isolaten lediglich um zwei Stämme einer Virusspezies handeln, wäre eine deutlich höhere Sequenzidentität der homologen Proteine beider Viren zu erwarten. So wurden bei Sequenzvergleichen der Proteine verschiedener MCMV-Stämme überwiegend Identitäten von 70 % bis 100 % ermittelt (Smith et al., 2008).

Phylogenetische Analyse

Obwohl Cytomegaloviren eine ähnliche Genomstruktur aufweisen, ist eine phylogenetische Eingruppierung schwierig. Sequenzvergleiche von Gesamtgenomen wären aufgrund der Lage von *internal* und *terminal repeats*, der Varianz in den nicht essentiellen Genen und der unterschiedlichen Genomgrößen sehr fehleranfällig. Darüber hinaus könnten Viren, deren Genom nur in Fragmenten sequenziert ist, in solche Analysen nicht einbezogen werden. Neu entdeckte Viren könnten erst nach erfolgreicher Anzucht und Sequenzierung phylogenetisch klassifiziert werden. Aus diesem Grund werden in den meisten Fällen Sets konservierter Proteine für die Analyse herangezogen (McGeoch et al., 2000). Welche Proteine ausgewählt werden, ist nicht einheitlich und richtet sich häufig nach den zum Zeitpunkt der Analysen verfügbaren Sequenzen. Für die Eingruppierung von RCMV-E innerhalb der Muromegaloviren wurden die Proteine der DNS-Polymerase (E54), des Glykoproteins B (E55), der Terminase Untereinheit (E56), des *single strand binding protein* (E57), des *major capsid protein* (E86) sowie der Terminase (E89) und der DNS-Helicase (E105) gewählt.

Seit den Anfängen der phylogenetischen Analysen wurden zahlreiche Algorithmen entwickelt, um die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen verschiedenen Spezies zu berechnen. Jeder dieser Algorithmen wird am Ende zu einem Stammbaum führen. Inwieweit die berechneten Stammbäume die Fragestellung zufriedenstellend beantworten, hängt maßgeblich von zwei Faktoren ab. 1. Das Berechnungsmodell muss in der Lage sein, alle denkbaren Merkmalsunterschiede

zu bewerten. 2. Der Sequenzdatensatz muss so zusammengestellt werden, dass die Antwort auf die Fragestellung anhand bekannter Verwandtschaftsbeziehungen überprüft werden kann.

Bestätigung des Modells und des Sequenzdatensatzes

Wie eingangs erwähnt handelt es sich bei Herpesviren um sehr alte Viren, die sich in Koevolution mit ihren Wirten weiterentwickeln. Insofern sind Modelle, die lediglich auf Sequenzunterschieden (Divergenz-Modelle) oder einer minimal nötigen Anzahl an Mutationen (*maximum parsimony*) basieren, schlecht anwendbar. Heuristische Berechnungsansätze (z. B. das Dayhoff-Modell) bieten sich insbesondere dann an, wenn sehr große Datenmengen, z. B. mit vielen oder sehr langen Sequenzen verarbeitet werden müssen, was bei der Analyse von RCMV-E nicht gegeben war. Das verwendete Jones-Taylor-Thornton-Modell (JTT) (Jones et al., 1992) berücksichtigt auch notwendige Übergangsmutationen und den Austausch basischer, saurer und neutraler Aminosäuren.

Durch die phylogenetische Analyse wurde untersucht, ob es sich bei RCMV-E um eine eigene Virusspezies oder nur eine Subspezies des RCMV-M handelt. Dazu wurden fünf Subspezies des MCMV und zwei Subspezies des HCMV in den Datensatz integriert. Die Aufnahme der beiden Primatenviren RhCMV und CCMV diente dazu, eine ausreichende Differenzierung unterschiedlicher Virusspezies durch das JTT-Modell zu überprüfen.

Sowohl die verschiedenen MCMV- als auch die HCMV-Stämme bildeten in allen Stammbäumen eine eigene Klade. Die Viren unterschiedlicher Spezies, hier gezeigt anhand der Viren CCMV, RhCMV und MCMV ließen sich mit verlässlichen Bootstrap-Werten (>75) differenzieren. Dadurch war gezeigt, dass die Kombination des JTT-Modells mit dem ausgewählten Datensatz geeignet war, die Frage zu beantworten, ob es sich bei RCMV-E um eine eigene Virusspezies oder nur einen Subtyp des RCMV-M handelt.

Die phylogenetischen Analysen zeigen eine deutliche Abgrenzung von RCMV-E zu den anderen CMVs. Lediglich die DNS-Polymerase (E54) zeigt eine höhere Verwandtschaft zur Polymerase aus RCMV-M. Die Glykoproteine B beider RCMV weisen eine ähnlich hohe Verwandtschaft zu MCMV auf. In allen Stammbäumen ist klar zu erkennen, dass die Diversität zwischen RCMV-E und RCMV-M ausreichend hoch ist, um sie als distinkte Virusspezies zu betrachten.

Unter Berücksichtigung aller Vorarbeiten und der Ergebnisse dieser Arbeit ist festzuhalten, dass es sich bei RCMV-E und RCMV-M um zwei unterschiedliche Virusspezies handelt. Es bleibt in zukünftigen Arbeiten zu klären, ob eine der beiden Virusspezies dominant in der Rattenpopulation zu finden ist oder ob beide Viren zu gleichen Teilen kozirkulieren. Ebenso ist von Interesse, welches der beiden Viren sich bei der Koinfektion durchsetzt oder ob sie im Einzelwirt koexistieren können. Eine Koexistenz würde den Viren die Möglichkeit eröffnen, untereinander Gene auszutauschen und neue rekombinante Subspezies zu generieren, die eine erhöhte virale Fitness aufweisen. In einer kleinen Auswahl von Rattenproben aus Deutschland konnten beide Virusspezies mittels PCR nachgewiesen werden. Dabei wurde in der Mehrheit der Tiere RCMV-E gefunden (Voigt et al., unveröffentlicht). Es ist zu vermuten, dass in Wildratten unterschiedlicher geographischer Herkunft noch weitere CMVs existieren. Deren Isolierung und phylogenetische Analyse würden darüber Aufschluss geben, ob es sich dabei um zusätzliche distinkte Spezies handelt oder ob die Isolate aus Maastricht und England die ersten beschriebenen Vertreter verschiedener Kladen bilden. Seit 2004 sind bereits weitere RCMV-Isolate aus australischen Wildratten bekannt (Smith et al., 2004). Erste phylogenetische Analysen basierend auf dem Protein R87 deuten an, dass diese Viren eine gemeinsame Klade mit RCMV-E bilden. Diese Vermutung lässt sich aber erst überprüfen, wenn weitere Sequenzinformationen dieser Viren verfügbar sind.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde beim *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) beantragt, RCMV-E als neue Virusspezies mit dem Namen *Murid herpesvirus 8* (*Rat Cytomegalovirus, English Isolate*) innerhalb des Genus *Muromegalovirus* zu klassifizieren.

5.2 RCTL als Inhibitor NK-Zell-vermittelter Lyse

RCMV-E kodiert für einige Gene, die bislang noch nicht in anderen CMVs untersucht wurden. Das RCMV C-Typ-Lektin-ähnliche Protein (RCTL) ist eines dieser Gene und wurde bereits 2001 identifiziert und die Transkription nachgewiesen (Voigt et al., 2001). In dieser Arbeit wurde dieses Gen funktionell charakterisiert und sein Einfluss im Rahmen der Immunevasion aufgeklärt.

5.2.1 Ursprung und Aufbau von RCTL

Im Rahmen der Primärinfektion müssen Viren sich mit dem angeborenen und adaptiven Immunsystem auseinandersetzen, um eine Eradikation zu verhindern. Im Falle persistenter Viren muss diese Kontrolle über die gesamte Lebensdauer des Wirtes aufrecht erhalten werden. Die virale Immunevasion bildet folglich einen essentiellen Bestandteil im Infektionszyklus von Herpesviren. Cytomegaloviren haben im Laufe ihrer Entwicklung zahlreiche Gene erworben, welche es ihnen ermöglichen, die Immunantwort ihres Wirtes zu manipulieren und sind erst so in der Lage, nach der Primärinfektion ein für die Persistenz geeignetes Milieu zu schaffen. Wie eingangs erwähnt handelt es sich dabei um ein speziell auf den Wirt abgestimmtes Repertoire an Genen, dass eine hohe Wirtsspezifität zur Folge hat. Die an der Immunabwehr beteiligten Mechanismen sind in den verschiedenen Wirten häufig identisch. Die Proteine, die von den Viren genutzt werden um das Immunsystem zu manipulieren unterscheiden können sich von Spezies zu Spezies unterscheiden. MCMV und HCMV verfügen über verschiedene Strategien der NK-Zell-Inhibition (Lodoen & Lanier, 2005; Reddehase, 2002), ohne dass C-Typ-Lektin-ähnliche Proteine gefunden wurden. In beiden Viren wird die NK-Zell-Inhibition durch MHC-I-Homologe vermittelt. Nicht selten werden dabei Wirtsproteine in das virale Genom rekrutiert und in den Infektionszyklus integriert. Dies wird bei Herpesviren durch das große dsDNA-Genom begünstigt, jedoch führt die beschränkte Kodierungskapazität des viralen Genoms dabei häufig zu Veränderungen in der Gen- und Proteinstruktur. So werden Introns und Protein-domänen, die im viralen Kontext keine Rolle spielen, häufig entfernt, sodass auch bei großen DNA-Viren kaum gespleißte Gene zu finden sind. Die daraus resultierenden verkürzten viralen Genprodukte zeigen bisweilen noch eine auffallend hohe Identität zu ihren zellulären Homologen, variieren jedoch in ihrer Funktion.

Bei rClr-b und RCTL handelt es sich um Typ-II-Transmembranproteine, deren N-Terminus für die cytoplasmatische Domäne kodiert. Der C-Terminus ist extrazellulär und dient der Bindung an die NK-Zell-Rezeptoren. Der endogene inhibitorische NK-Zell-Ligand verfügt über einen deutlich verlängerten N-Terminus. Hier könnten sich putative Modifikations- und Bindedomänen befinden, die an der Regulation nachgeschalteter Signalkaskaden beteiligt sind.

Der Sequenzvergleich von RCTL und rClr-b ergab, dass der cytoplasmatische Anteil des viralen Proteins deutlich kürzer ist als der des zellulären rClr-b. Eine solche Modifikation des ehemaligen Wirtsproteins ist schon deshalb nötig, damit das virale Homolog bei ähnlicher Funktion nicht derselben Regulation unterliegt wie das Wirtsprotein (Mesci et al., 2006). Zusammen mit der Verkürzung der Introns wurde die Gesamtlänge des RCTL-Leserahmens um ca. 80 % reduziert. Beide Modifikationen deuten darauf hin, dass eine Komprimierung des Gens bereits stattgefunden hat, aber noch nicht abgeschlossen ist.

Bei der Erstbeschreibung von RCTL wurden aufgrund der Sequenzähnlichkeit verschiedene NK-Zell-Rezeptoren wie CD69, Ly49 und NKR-P1 als mögliche Homologe identifiziert und folglich eine Funktion des RCTL während der initialen Immunantwort angenommen (Voigt et al., 2001). Die Sequenzen der NK-Zell-Rezeptoren und Liganden wurden erst 2006 publiziert (Hao et al., 2006). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Proteinsequenz des RCTL mit den Sequenzen dieser Proteine verglichen und eine wesentlich höhere Sequenzidentität zum zellulären Liganden des NKR-P1B-Rezeptors, rClr-b, festgestellt (Voigt et al., 2007). Die Bedeutung des NKR-P1B-Signalweges wurde bereits in murinen Tumorzellen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass rClr-b auf Tumorzellen vermindert exprimiert wird und die entarteten Zellen somit empfindlich für NK-Zell-medierte Lyse sind (Carlyle et al., 1999, 2004).

5.2.2 Reziproke Regulation von rClr-b und RCTL bei einer Infektion

Unter Berücksichtigung der unter 1.2.1 beschriebenen und für die NKR-P1B:Clr-b-Interaktion postulierten *missing-self*-Regulation konnte gezeigt werden, dass unmittelbar nach Infektion mit RCMV die Transkription von rClr-b geblockt und das Protein von der Zelloberfläche entfernt wird. Die infizierte Zelle verliert somit ihre *self*-Determination und ist folglich empfänglich für die Eliminierung durch NK-Zellen. RCTL wird im Rahmen der frühen Phase der Infektion exprimiert und ersetzt die Funktion des endogenen rClr-b. Durch Bindung an den NKR-P1B Rezeptor wird der fehlende inhibitorische Stimulus kompensiert und die infizierte Zelle ist vor NK-Zell medierter Lyse geschützt. Ein Verlust von RCTL hat, wie die *in vitro* Infektion mit RCMV-E Δ RCTL zeigt, keinen Einfluss auf die negative Regulation von rClr-b (Abbildung 9). Somit kann ein kausaler Zusammenhang zwischen den Expressionen von RCTL und rClr-b ausgeschlossen werden.

Vielmehr ist zu vermuten, dass es sich beim Verlust von rClr-b um eine intrinsische Reaktion der Wirtszelle als Reaktion auf die Infektion handelt (Matzinger, 2002), um so eine möglichst frühzeitige Eliminierung der Zelle noch vor Freisetzung neuer Viruspartikel zu ermöglichen. Bei Infektion von REFs mit UV-inaktivierten RCMV-E Viren konnte gezeigt werden, dass rClr-b auf der Zelloberfläche verbleibt. Ebenso führt eine Inhibition der Infektion mit CHX nicht zu einer reduzierten rClr-b Expression (Kutschenko, 2008). Somit ist erwiesen, dass nicht allein das der Viren in die Zelle ausreichend für die negative Regulation der rClr-b Expression ist, sondern eine Expression viraler Gene diese induziert. Die Infektion von murinen und humanen Zellen mit MCMV bzw. HCMV hat keinerlei Einfluss auf die Expression von mClr-b und hClr-b (Kutschenko, 2008). Entweder haben diese beiden Viren andere, bislang noch nicht untersuchte Mechanismen entwickelt, um zu verhindern, dass Clr-b von der Oberfläche verschwindet, oder aber ein bislang ebenfalls noch nicht aufgeklärter Mechanismus der RCMV-E Infektion veranlasst die Zelle zur Reduktion des rClr-b Proteins auf der Oberfläche. Die dem raschen Verlust von rClr-b zu Grunde liegenden Mechanismen sind bislang unklar. Ob es sich bei rClr-b um ein Protein mit sehr kurzer Halbwertszeit auf der Zelloberfläche handelt und ein Block der Transkription auch zum Verlust des Proteins führt, oder ob ein zweiter Prozess die Depletion des rClr-b an der Zelloberfläche bewirkt, ist noch ungeklärt.

Wie schon 2001 gezeigt, ist RCTL für die *in vitro* Replikation in REFs entbehrlich (Voigt et al., 2001). Frisch isolierte NK-Zellen werden in Kokultur mit RCMV-E Δ RCTL infizierten Zellen lysiert, während mit RCMV-E wt infizierte Zellen geschützt sind. Die Zugabe des bispezifischen Antikörpers R3A8 bindet an RCTL, und die mit RCMV-E wt infizierten Zellen werden nicht länger vor der durch die NK-Zelle vermittelten Lyse geschützt (Voigt et al., 2007). *In vivo* setzt der Verlust von RCTL die Virulenz von RCMV-E Δ RCTL in WAG-Ratten so weit herab, dass bereits die Primärinfektion stark beeinträchtigt wird. Eine Depletion der NK-Zellen stellt die volle Virulenz wieder her, und es werden Organtiter ähnlich einer RCMV-E wt Infektion erreicht. Bei RCTL handelt es sich demzufolge um ein Protein, das an der frühen Immunevasion beteiligt ist und hochspezifisch die Aktivität von NK-Zellen hemmt.

5.2.3 Anpassung des Immunsystems des Wirts an RCTL

Während Viren und andere Pathogene sich im Laufe der Evolution besser auf die Wirtsabwehr einstellen, ist es im Gegenzug für den Wirt von immanenter Bedeutung, auf solche Manipulationen zu reagieren, um erneut eine funktionierende Abwehr gegen Pathogene aufzubauen. Eine besondere Herausforderung besteht darin, dass die natürlichen, endogenen Liganden von den Stellvertreterproteinen unterschieden werden müssen, ohne die eigenen Signalkaskaden zu stören. Die große Vielzahl verschiedener NKR-P1-Allele der Rattenstämme ist möglicherweise auf eine solche evolutionäre Anpassung zurückzuführen (Kveberg et al., 2006; Rabinovich et al., 2003). Die beiden im Rahmen dieser Arbeit näher betrachteten Rezeptoren NKR-P1B und NKR-P1A weisen unter den NKRs die größte Diversität auf (Carlyle et al., 2006). In einigen Rattenstämmen haben sich stimulatorische Rezeptoren wie NKR-P1A dahingehend verändert, dass sie in der Lage sind, RCTL zu binden und so den inhibitorischen Stimulus zu kompensieren (Chambers et al., 1989; Giorda et al., 1990).

Die These, diese Diversität sei eine Folge der Reaktion auf virale Immunevasion (Mesci et al., 2006), wird durch die Infektionsversuche in SD-Ratten unterstützt. Die Bindung von RCTL an NKR-P1B^{SD} ist deutlich schwächer und entspricht in etwa der Interaktion mit dem stimulatorischen NKR-P1A^{SD} (Voigt et al., 2007). Der Organtiter in den Organen der SD-Kohorten beträgt nur in etwa 10 % der in WAG-Ratten gemessenen Viruslast, und ein Verlust von RCTL spielt in diesem Rattenstamm keine Rolle. Die vorhandenen Allelpolymorphismen resultieren zwar in einer verlangsamten Virusmanifestation im Wirt, reichen jedoch nicht aus, um das Virus vollständig zu eliminieren. Möglicherweise sind aber auch andere, noch nicht identifizierte virale Proteine an der Inhibition der NK-Zellen beteiligt.

5.2.4 RCTL-vermittelte NK-Zell-Inhibition bei Cytomegaloviren

NK-Zell-Evasion ist bei Cytomegaloviren schon lange bekannt und gut untersucht (Jonjić et al., 2008; Krmpotic et al., 2005, 2006; Pyzik et al., 2008). Zur Prävention einer T-Zell-Antwort inhibieren Viren die Antigenpräsentation via MHC, in dem sie auf verschiedene Weise den MHC-Gehalt auf der Zelloberfläche reduzieren. Ein Mangel an MHC-Molekülen dient als wichtiges Erkennungszeichen im *missing self*-Signalweg und führt zur NK-Zell-vermittelten Lyse. So greifen viele virale

Evasionsproteine an dieser Stelle an, und ihre Wirkmechanismen sind gut untersucht (Lodoen & Lanier, 2005; Reddehase, 2002; Vidal & Lanier, 2006). RCTL ist das erste beschriebene, virale nicht-MHC-Molekül, das über eine direkte Interaktion mit einem inhibitorischen Rezeptor zu einem Block der NK-Zell-Antwort führt. Eine solche direkte Interaktion hat den entscheidenden Vorteil, dass weitere Proteine, die in den Signalweg der infizierten Zelle eingreifen, unnötig sind. Ob die Genome von HCMV und MCMV ebenfalls Gene Lektin-ähnlicher Proteine kodierten, die sie im Laufe der Isolation und jahrzehntelanger Passage in Zellkultur verloren haben (Wills et al., 2005), kann erst durch die Genomsequenzierung frischer Virusisolate untersucht werden.

Neben den bekannten, lektin-ähnlichen Genen in Myxoma- und Poxviren (Cameron et al., 1999; Goebel et al., 1990), wurden in RCMV-M mit r153 (Brocchieri et al., 2005) und in RCMV-E ein weiteres Lektin-ähnliches Gen (RCTL2) identifiziert, von denen noch keines in seiner Funktion aufgeklärt ist. Das parallele Auftreten dieser Gene deutet darauf hin, dass es sich bei der Lektin-vermittelten Immunevasion um eine generelle, aber bislang nicht ausreichend untersuchte Strategie von Viren und möglicherweise auch anderer Pathogene handelt. Sollte sich dies in weiteren Untersuchungen bestätigen, würden sich blockierende Antikörper als neue Therapiemöglichkeiten gegen diese Erreger anbieten.

5.3 Reparatur und Charakterisierung des RCMV-E BAC

Bakterielle artifizielle Chromosomen (BAC) haben sich in der Vergangenheit als nützliche Werkzeuge zur Mutagenese großer DNS-Viren etabliert. Durch die enorme Größe von Herpes- und Pockenvirusgenomen ist es in vielen Fällen unmöglich, geeignete Restriktionsschnittstellen für klassische Klonierungsansätze zu finden. Der Einbau sogenannter BAC-Kassetten in das virale Genom ermöglicht es, diese Genome in *E.coli* zu vermehren. Dadurch wird die Vermehrung der viralen DNS vom Replikationszyklus der Viren entkoppelt und kann durch homologe Rekombination manipuliert werden. Da BAC-Konstrukte nur in einer Kopie je Bakterium weitergegeben werden, ist es möglich, schon zu Beginn der Mutagenese klonal zu arbeiten. Darüber hinaus sind Manipulationen auch in den für die Virusreplikation essentiellen Genomabschnitten möglich.

Der Einbau zusätzlicher DNS in das Virusgenom ist aus verschiedenen Gründen problematisch. BAC-Kassetten enthalten neben den für die Replikation in *E.coli* nötigen Genen eukaryotische und prokaryotische Selektionsmarker und erreichen eine Größe von ca. 8 kBp. Die Integration in das Genom führt somit zu einer Genomvergrößerung und unter Umständen zur Unterbrechung von Leserahmen. Darüber hinaus haben die Kapside nur ein limitiertes Fassungsvermögen, sodass die verlängerten Genome schlechter verpackt werden. Erst durch Deletionen wird die Genomgröße wieder auf eine verpackungsfähige Größe reduziert. Diese Deletionen erfolgen entweder spontan bei der Insertion der BAC-Kassette wie bei der Klonierung des GPCMV (Cui et al., 2008) oder können wie bei MCMV schon im Vorfeld eingefügt werden (Messerle et al., 1997). Folglich enthalten diese als BAC klonierten Viren nicht das vollständige Genom (Brune et al., 2005). Da die Deletion bei RCMV-E mit 7,7 kBp in etwa der Größe der 8,8 kBp BAC-Kassette entspricht, ist zu vermuten, dass diese Verkürzung im RCMV-E Δ BAC entstand, um einen Verpackungsnachteil auszugleichen. Der infolgedessen aufgetretene Verlust der nicht essentiellen Gene e128, ECK, e133, e135, e136, e138 und e139 hatte keinen Einfluss auf die *in vitro* Replikation. RCMV-E Δ BAC war noch immer in der Lage, REF zu infizieren und infektiöse Viruspartikel freizusetzen, wuchs mit unveränderter Kinetik und erreichte vergleichbare Endtiter wie das Wildtyp-Virus. Die infizierten Zellen zeigten jedoch eine deutlich veränderte Zellmorphologie in Form von Syncytienbildung.

In Bakterien wird das virale Genom als Plasmid vermehrt und nicht in Kapside verpackt, sodass der deletierte Bereich wieder eingefügt und der veränderte Phänotyp vollständig revertiert werden konnte. Somit ist die Syncytienbildung eindeutig mit diesem Genabschnitt assoziiert und nicht auf eventuelle Nebenmutationen zurückzuführen. Vieira et al. haben 1994 MCMV-Mutanten hergestellt, in denen die Leserahmen von *sgg1* und den umgebenden Genen durch Insertion des bakteriellen *lacZ*-Gens unterbrochen wurden (Vieira et al., 1994). Keine dieser Mutanten zeigte Einschränkungen bezüglich der Wachstumskinetik oder einen veränderten Phänotyp. Da bei den Mutanten die Gene nicht vollständig entfernt wurden, könnten Fragmente dieser Proteine die Syncytienbildung verhindert haben oder aber dieser Effekt ist erst zu beobachten, wenn es zum Verlust mehrerer Gene kommt. Es ist auch vorstellbar, dass die Syncytienbildung nach einem Genverlust in dieser Region ein RCMV-E-

spezifisches Phänomen ist. Ob ein einzelnes Gen oder eine Kombination deletierter Gene für den veränderten Phänotyp verantwortlich ist, wurde nicht näher untersucht.

Sollte eine mangelnde Kapazität des Viruskapsids ursächlich für die Deletion verantwortlich sein, ist zu erwarten, dass nach wenigen Passagen des RCMV-E BAC Virus in REF abermals Deletionen in nicht essentiellen Bereichen auftreten. Auch die in den Wachstumskurven beobachteten Defizite in der Virusvermehrung wären dadurch zu erklären. Die daraus resultierenden Virusgemische wären für *in vivo* Experimente nicht verwendbar, da je nach Position der Mutationen das tatsächliche Infektionsgeschehen verändert würde.

Durch Cotransfektion der Cre-Rekombinase mit dem RCMV-E BAC wurde die BAC-Kassette wieder entfernt und das Genom wieder auf seine ursprüngliche Größe reduziert. Zurück blieb nur ein einzelnes LoxP-Motiv in einem intergenischen Bereich. Die BAC-Kassette kodiert unter anderem für das grün fluoreszierende Protein egfp, sodass die Effizienz der Cre-Rekombinase anhand der egfp-Expression lichtmikroskopisch überprüft werden konnte. In keinem der Transfektionsansätze konnte eine egfp-Expression beobachtet werden. Möglicherweise existiert ein Selektionsdruck bezüglich der Verkleinerung des Genoms, sodass die Exzision der Fremd-DNS die Rekonstitution des Virus begünstigt.

Alle drei hergestellten Replikate des RCMV-E CRE zeigten in den Wachstumskurven die gleiche Kinetik wie die BAC-Viren und erreichten in etwa nur die Hälfte des RCMV-E wt Endtiters. Somit ist die Attenuierung des RCMV-E BAC nicht auf das Vorhandensein der BAC-Kassette zurückzuführen. Wahrscheinlicher ist das Auftreten einer oder mehrerer Mutationen während der Passagierung in *E.coli*. Die BAC-DNS wird in der Bakterienzelle nicht einfach nur transportiert und vermehrt, sondern die darauf kodierten viralen Gene werden teilweise auch translatiert. Allein die Synthese dieser Proteine stellt eine Belastung der Zelle dar. Es ist überdies vorstellbar, dass einige der viralen Proteine in *E.coli* zytotoxische Eigenschaften aufweisen und die Mutagenese dieser ORFs zu einem Selektionsvorteil für die Bakterien führt. Welche Mutationen möglicherweise aufgetreten sind, ist erst durch eine *de novo* Sequenzierung der BAC-Konstrukte möglich. Diese wurde aus finanziellen und zeitlichen Gründen im Rahmen dieser

Arbeit nicht mehr durchgeführt, wäre jedoch für die Verwendung der hergestellten BACs in Tierversuchen unabdingbar.

Durch die konsequente Weiterentwicklung der Rekombinationstechniken und der verwendeten *E.coli*-Stämme ist es mittlerweile möglich, kleinere und sogenannte *self-excisable* BAC-Kassetten einzusetzen (Roth et al., 2011; Tischler et al., 2007, 2010; Warming et al., 2005). Das Einsetzen einer *self-excisable* BAC-Kassette in einem essentiellen viralen Gen erzeugt einen Selektionsdruck zugunsten einer gezielten Exzision der bakteriellen Fremd-DNS. Ein weiteres Problem stellen zelleigene Rekombinationsenzyme und die sogenannten IS-Elemente dar. Bei letzteren handelt es sich um mobile Sequenzelemente innerhalb des *E.coli*-Genoms. Diese können im Laufe der Passagierung entweder durch eine bakterielle Transposase oder andere Rekombinationsenzyme in das virale BAC-Genom inserieren und so zu unerwünschten Mutationen führen.

Im von Pósfai et al. entwickelten *E.coli*-Stamm MDS42 wurden sowohl IS-Elemente als auch zelleigene Rekombinationsenzyme aus dem Genom entfernt, wodurch die Stabilität der BAC-Konstrukte in den Bakterien erhöht ist (Pósfai et al., 2006). Diese Möglichkeiten bieten eine Alternativstrategie zur Konstruktion eines RCMV-E BAC.

6 Zusammenfassung

Die beiden bislang im Wesentlichen untersuchten Isolate des Ratten-Cytomegalovirus (RCMV) sind RCMV-Maastricht (RCMV-M) und RCMV-England (RCMV-E). Im Gegensatz zur veröffentlichten kompletten RCMV-M Sequenz wurden von RCMV-E bislang Sequenzen nur partiell publiziert. Aufgrund der Sequenzdaten und Unterschiede bezüglich ihrer Genomgröße und Restriktionsmuster wurde angenommen, dass es sich bei den beiden Isolaten um eigenständige Virusspezies handelt. Um dies zu bestätigen, wurden im Rahmen dieser Arbeit die Leserahmen des RCMV-E Genoms identifiziert und mit RCMV-M und dem murinen CMV (MCMV) verglichen. Sowohl im strukturellen Genomaufbau als auch in den kodierten Genen weisen die Viren deutliche Unterschiede auf. Der direkte Vergleich der Proteinsequenzen deutet auf eine nähere Verwandtschaft des RCMV-E zu MCMV als zu RCMV-M hin. Anhand ausgewählter konservierter Proteine wurden phylogenetische Analysen zur Eingruppierung des RCMV-E innerhalb der CMVs durchgeführt. Diese Analysen belegen, dass es sich bei den beiden Viren um distinkte Spezies handelt.

Eine weitere Besonderheit des RCMV-E besteht darin, eine Reihe von Genen zu kodieren, die bislang nicht in anderen CMVs beschrieben wurden, zu welchen das RCMV C-Typ-Lektin-ähnliche Protein (RCTL) gehört. In dieser Arbeit wurde RCTL funktionell untersucht. Hierzu wurden zwei Rattenstämme mit RCMV-E Wildtypvirus und einer RCTL-Deletionsmutante infiziert. Es konnte gezeigt werden, dass RCTL an den inhibitorischen NK-Zell-Rezeptor NKR-P1B eines Rattenstammes bindet und die Funktion des NK-Zell-Liganden rClr-b substituiert. Durch diese Interaktion werden NK-Zellen nicht aktiviert und die infizierte Zelle vor NK-Zell-medierter Lyse geschützt. Hingegen führt der Verlust von RCTL zu einer effizienten Eliminierung infizierter Zellen. Durch Depletion der NK-Zellen kann dieser Verlust des RCTL kompensiert werden und die Deletionsmutante ist wieder in der Lage, sich im Tier auszubreiten. In dem anderen Rattenstamm hat der Verlust von RCTL keinen Einfluss auf die Ausbreitung des Virus in der Ratte, so dass davon ausgegangen werden kann, dass nicht nur evolutionärer Druck auf das Virus ausgeübt wird, sich dem Immunsystem zu entziehen, sondern das Immunsystem auch einem Druck unterliegt, auf die Immunevasion des Erregers zu reagieren.

7 Summary

The two preponderant isolates of rat cytomegalovirus (RCMV) are RCMV-Maastricht (RCMV-M) and RCMV-England (RCMV-E). In contrast to the completely published RCMV-M sequence only partial sequence data of RCMV-E are available. Based on this sequence data and differences in genome size and restriction patterns, it has been assumed that both isolates represent independent virus species. To verify this assumption, the open reading frames in RCMV-E were identified and compared to those in RCMV-M and murine CMV (MCMV). Differences among the viruses were observed in genome structure as well as in the encoded genes. Direct comparison of the protein sequences revealed a closer relationship between RCMV-E and MCMV than between RCMV-E and RCMV-M. Based on a subset of conserved proteins, a phylogenetic analysis was performed to classify the relationship of RCMV-E with other CMVs. This analysis proved that RCMV-M and RCMV-E represent distinct species.

Another characteristic aspect of RCMV-E is that it encodes a couple of genes which have not been described in other CMVs. One of those genes is the RCMV C-type-lectin-like protein (RCTL). In this thesis, RCTL was functionally characterized. Therefore, two different rat strains were infected with RCMV-E wildtype virus and a RCTL deletion mutant. It could be shown that RCTL binds to the inhibitory NK-cell receptor NKR-P1B in one rat strain and functions as a decoy-ligand for the host NK-cell ligand. By this interaction, NK-cell activation is silenced and the infected cells are protected from NK-cell mediated lysis. In contrast, the loss of RCTL results in an efficient elimination of the infected cells. By depleting the NK-cells, the loss of RCTL can be compensated in that particular rat strain and the virus is able to spread in the host. In the second rat strain, the loss of RCTL has no effect on virus spread. Hence, it can be assumed that there is not only an evolutionary pressure on the virus to evade the immune response but also on the immune system to counteract the pathogen-associated immune evasion mechanism.

8 Literaturverzeichnis

- Adler, H., Messerle, Martin, & Koszinowski, Ulrich H. (2003). Cloning of herpesviral genomes as bacterial artificial chromosomes. *Reviews in medical virology*, 13(2), 111-121.
- Akira, S., & Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nature reviews. Immunology*, 4(7), 499-511.
- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4), 783-801.
- Ali, M. A., Forghani, B., & Cantin, E. M. (1996). Characterization of an essential HSV-1 protein encoded by the UL25 gene reported to be involved in virus penetration and capsid assembly. *Virology*, 216(1), 278-283.
- Anders, D. G., Kacica, M. A., Pari, G., & Punturieri, S. M. (1992). Boundaries and structure of human cytomegalovirus oriLyt, a complex origin for lytic-phase DNA replication. *Journal of virology*, 66(6), 3373-3384.
- Anfossi, N., André, P., Guia, S., Falk, C. S., Roetynck, S., Stewart, C. A., Bresó, V., et al. (2006). Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity*, 25(2), 331-342.
- Angulo, a, Messerle, M, Koszinowski, U H, & Ghazal, P. (1998). Enhancer requirement for murine cytomegalovirus growth and genetic complementation by the human cytomegalovirus enhancer. *Journal of virology*, 72(11), 8502-8509.
- Bahr, U., & Darai, G. (2001). Analysis and characterization of the complete genome of tupaia (tree shrew) herpesvirus. *Journal of virology*, 75(10), 4854-4870.
- Beisser, P S, Kaptein, S. J., Beuken, E., Bruggeman, C. A., & Vink, C. (1998). The Maastricht strain and England strain of rat cytomegalovirus represent different betaherpesvirus species rather than strains. *Virology*, 246(2), 341-351.
- 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. *Journal of virology*, 73(10), 8320-8329.
- Bresnahan, W. A., Hultman, G. E., & Shenk, T. (2000). Replication of wild-type and mutant human cytomegalovirus in life-extended human diploid fibroblasts. *Journal of virology*, 74(22), 10816-10818.
- Britt, W. (2008). Manifestations of human cytomegalovirus infection: proposed mechanisms of acute and chronic disease. *Current topics in microbiology and immunology*, 325, 417-470.
- Brocchieri, L., Kledal, T. N., Karlin, S., & Mocarski, Edward S. (2005). Predicting coding potential from genome sequence: application to betaherpesviruses infecting rats and mice. *Journal of virology*, 79(12), 7570-7596.

- Brown, M. G., & Scalzo, A. A. (2008). NK gene complex dynamics and selection for NK cell receptors. *Seminars in immunology*, 20(6), 361-368.
- Bruggeman, C. A., Meijer, H., Dormans, P. H., Debie, W. M., Grauls, G. E., & van Boven, C. P. (1982). Isolation of a cytomegalovirus-like agent from wild rats. *Archives of virology*, 73(3-4), 231-241.
- Brune, W., Wagner, M., & Messerle, M. (2005). Manipulating cytomegalovirus genomes by BAC mutagenesis: strategies and applications. In M. J. Reddehase (Ed.), *Cytomegaloviruses: Molecular Biology and Immunology* (2nd ed., pp. 63-90). Wymondham: Caister Academic Press.
- Burns, W H, Barbour, G. M., & Sandford, G R. (1988). Molecular cloning and mapping of rat cytomegalovirus DNA. *Virology*, 166(1), 140-148.
- Bühler, B., Keil, G M, Weiland, F., & Koszinowski, U H. (1990). Characterization of the murine cytomegalovirus early transcription unit e1 that is induced by immediate-early proteins. *Journal of virology*, 64(5), 1907-1919.
- Cam, M., Handke, W., Picard-Maureau, M., & Brune, W. (2010). Cytomegaloviruses inhibit Bak- and Bax-mediated apoptosis with two separate viral proteins. *Cell death and differentiation*, 17(4), 655-665.
- Cameron, C., Hota-Mitchell, S., Chen, L., Barrett, J., Cao, J. X., Macaulay, C., Willer, D., et al. (1999). The complete DNA sequence of myxoma virus. *Virology*, 264(2), 298-318.
- Carlyle, J R, Martin, A., Mehra, A., Attisano, L., Tsui, F. W., & Zúñiga-Pflücker, J. C. (1999). Mouse NKR-P1B, a novel NK1.1 antigen with inhibitory function. *Journal of immunology*, 162(10), 5917-5923.
- Carlyle, J R, Mesci, A, Ljutic, B, Belanger, S., Tai, L. H., Rousselle, E., Troke, A. D., et al. (2006). Molecular and genetic basis for strain-dependent NK1.1 alloreactivity of mouse NK cells. *J. Immunol.*, 176, 7511-7524.
- Carlyle, James R, Jamieson, A. M., Gasser, S., Clingan, C. S., Arase, H., & Raulet, D. H. (2004). Missing self-recognition of Ocil/Clr-b by inhibitory NKR-P1 natural killer cell receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(10), 3527-3532.
- Casarosa, P., Gruijthuijsen, Y. K., Michel, D., Beisser, Patrick S, Holl, J., Fitzsimons, C. P., Verzijl, D., et al. (2003). Constitutive signaling of the human cytomegalovirus-encoded receptor UL33 differs from that of its rat cytomegalovirus homolog R33 by promiscuous activation of G proteins of the Gq, Gi, and Gs classes. *The Journal of biological chemistry*, 278(50), 50010-50023.
- Chambers, W. H., Vujanovic, N. L., Deleo, A. B., Olszowy, M. W., Herberman, R. B., & Hiserodt, J. C. (1989). Monoclonal antibody to a triggering structure expressed on rat natural killer cells and adherent lymphokine-activated killer cells. *J. Exp. Med.*, 169, 1373-1389.

- Chee, M. S., Bankier, A. T., Beck, S., Bohni, R., Brown, C. M., Cerny, R., Horsnell, T., et al. (1990). Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Current topics in microbiology and immunology*, 154, 125-169.
- Compton, T. (2004). Receptors and immune sensors: the complex entry path of human cytomegalovirus. *Trends in cell biology*, 14(1), 5-8.
- Compton, T., & Boehme, K. W. (2006). Virus Entry and Activation of innate immunity. In M. J. Reddehase (Ed.), *Cytomegaloviruses: Molecular Biology and Immunology* (pp. 111-130). Wymondham: Caister Academic Press.
- Compton, T., Kurt-Jones, E. A., Boehme, K. W., Belko, J., Latz, E., Golenbock, D. T., & Finberg, R. W. (2003). Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *Journal of virology*, 77(8), 4588-4596.
- Cui, X., McGregor, A., Schleiss, Mark R., & McVoy, M. A. (2008). Cloning the complete guinea pig cytomegalovirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome with excisable origin of replication. *Journal of virological methods*, 149(2), 231-239.
- Davis-Poynter, N. J., Lynch, D. M., Vally, H., Shellam, G R, Rawlinson, W. D., Barrell, B. G., & Farrell, H. E. (1997). Identification and characterization of a G protein-coupled receptor homolog encoded by murine cytomegalovirus. *Journal of virology*, 71(2), 1521-1529.
- Davison, A. J. (2002). Evolution of the herpesviruses. *Veterinary microbiology*, 86(1-2), 69-88.
- Davison, A. J., Dolan, Aidan, Akter, P., Addison, C., Dargan, D. J., Alcendor, D. J., McGeoch, Duncan J, et al. (2003). The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *The Journal of general virology*, 84(Pt 1), 17-28.
- Davison, A. J., Eberle, R., Ehlers, B., Hayward, G. S., McGeoch, Duncan J., Minson, A. C., Pellett, P. E., et al. (2009). The order Herpesvirales. *Archives of virology*, 154(1), 171-177.
- Eckhardt, J. (2007). Identifizierung und initiale Charakterisierung eines C-Chemokinhomologs des Rattencytomegalovirus. *Diplomarbeit, Humboldt Universität*.
- Ehlers, B., Küchler, J., Yasmum, N., Dural, G., Voigt, Sebastian, Schmidt-Chanasit, J., Jäkel, T., et al. (2007). Identification of novel rodent herpesviruses, including the first gammaherpesvirus of *Mus musculus*. *Journal of virology*, 81(15), 8091-8100.
- Fisher, R. A. (2009). Cytomegalovirus infection and disease in the new era of immunosuppression following solid organ transplantation. *Transplant infectious disease: an official journal of the Transplantation Society*, 11(3), 195-202.

- Fortunato, E. A., & Spector, D. H. (1999). Regulation of human cytomegalovirus gene expression. *Advances in virus research*, *54*, 61-128.
- Foster-Cuevas, M., Westerholt, T., Ahmed, M., Brown, M. H., Barclay, A. N., & Voigt, Sebastian. (2011). Cytomegalovirus e127 Protein Interacts with the Inhibitory CD200 Receptor. *Journal of virology*, *85*(12), 6055-6059.
- Foster-Cuevas, M., Wright, G. J., Puklavec, M. J., Brown, M. H., & Barclay, A. N. (2004). Human herpesvirus 8 K14 protein mimics CD200 in down-regulating macrophage activation through CD200 receptor. *Journal of virology*, *78*(14), 7667-7676.
- Friedrich, R. (2007). Charakterisierung eines C-Typ Lektin-ähnlichen Gens Ratte, Cytomegalievirus. *Diplomarbeit, Humboldt Universität*.
- Gandhi, M. K., & Khanna, R. (2004). Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *The Lancet infectious diseases*, *4*(12), 725-738.
- Giorda, R., Rudert, W. A., Vavassori, C., Chambers, W. H., Hiserodt, J. C., & Trucco, M. (1990). NKR-P1, a signal transduction molecule on natural killer cells. *Science (New York, N.Y.)*, *249*(4974), 1298-1300.
- Goebel, S. J., Johnson, G. P., Perkus, M. E., Davis, S. W., Winslow, J. P., & Paoletti, E. (1990). The complete DNA sequence of vaccinia virus. *Virology*, *179*(1), 247-266, 517-563.
- Hao, L., Klein, J., & Nei, M. (2006). Heterogeneous but conserved natural killer receptor gene complexes in four major orders of mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *103*, 3192-3197.
- 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. *Journal of virology*, *74*(17), 7720-7729.
- Iannello, A., Debbeche, O., Martin, E., Attalah, L. H., Samarani, S., & Ahmad, A. (2006). Viral strategies for evading antiviral cellular immune responses of the host. *Journal of leukocyte biology*, *79*(1), 16-35.
- Iizuka, K., Naidenko, O. V., Plougastel, B. F. M., Fremont, D. H., & Yokoyama, Wayne M. (2003). Genetically linked C-type lectin-related ligands for the NKRP1 family of natural killer cell receptors. *Nature immunology*, *4*(8), 801-7.
- Iversen, A.-C., Steinkjer, B., Nilsen, N., Bohnhorst, J., Moen, S. H., Vik, R., Stephens, P., et al. (2009). A proviral role for CpG in cytomegalovirus infection. *Journal of immunology*, *182*(9), 5672-5681.
- Jones, D. T., Taylor, W. R., & Thornton, J. M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer applications in the biosciences: CABIOS*, *8*(3), 275-582.

- Jonjić, S., Babić, M., Polić, B., & Krmpotić, A. (2008). Immune evasion of natural killer cells by viruses. *Current opinion in immunology*, 20(1), 30-8.
- Kalejta, R. F., & Shenk, Thomas. (2003). The Human Cytomegalovirus UL82 Gene Product (pp71) Accelerates Progression through the G1 Phase of the Cell Cycle. *Journal of Virology*, 77(6), 3451-3459. doi:10.1128/JVI.77.6.3451-3459.2003
- Kanda, T., Yajima, M., Ahsan, N., Tanaka, M., & Takada, K. (2004). Production of high-titer Epstein-Barr virus recombinants derived from Akata cells by using a bacterial artificial chromosome system. *Journal of virology*, 78(13), 7004-7015.
- Khrustalev, V. V., & Barkovsky, E. V. (2011). Percent of highly immunogenic amino acid residues forming B-cell epitopes is higher in homologous proteins encoded by GC-rich genes. *Journal of theoretical biology*, 282(1), 71-79.
- Knopp, V., & Müller, K. (2009). *Gene und Stammbäume* (2nd ed., p. 386). Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg.
- Krmpotic, A., Bubic, I., & Jonjic, S. (2006). Innate Immunity to Cytomegaloviruses. In M. J. Reddehase (Ed.), *Cytomegaloviruses: Molecular Biology and Immunology* (pp. 285-319). Wymondham: Caister Academic Press.
- Krmpotic, A., Hasan, M., Loewendorf, A., Saulig, T., Halenius, A., Lenac, T., Polic, B., et al. (2005). NK cell activation through the NKG2D ligand MULT-1 is selectively prevented by the glycoprotein encoded by mouse cytomegalovirus gene m145. *The Journal of experimental medicine*, 201(2), 211-220.
- Kutschenko, L. (2008). Funktionelle Analyse eines C-Typ Lektin-Homologs des Rattencytomegalovirus. *Diplomarbeit Rheinische Friedrich-Wilhelm-Universität*.
- Kveberg, L., Bäck, C. J., Dai, K.-Z., Inngjerdigen, M., Rolstad, B., Ryan, J. C., Vaage, J. T., et al. (2006). The novel inhibitory NKR-P1C receptor and Ly49s3 identify two complementary, functionally distinct NK cell subsets in rats. *Journal of immunology*, 176(7), 4133-4140.
- Kärre, K., Ljunggren, H. G., Piontek, G., & Kiessling, R. (1986). Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature*, 319(6055), 675-678.
- Lacayo, J. C., & Schleiss, Mark R. (2006). The Guinea-pig Model of Congenital Cytomegalovirus Infection. In M. Reddehase (Ed.), *Cytomegaloviruses: Molecular Biology and Immunology* (pp. 525-550). Wymondham: Caister Academic Press.
- Landolfo, S., Gariglio, M., Gribaudo, G., & Lembo, D. (2003). The human cytomegalovirus. *Pharmacology & therapeutics*, 98(3), 269-297.
- Lanier, L. L. (2005). NK cell recognition. *Annual review of immunology*, 23, 225-274.

- Lemey, P., Salemi, M., & Vandamme, A.-M. (Eds.). (2009). *The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing* (2nd ed., p. 723). Cambridge: Cambridge University Press.
- Lenac, T., Budt, M., Arapovic, J., Hasan, M., Zimmermann, A., Simic, H., Krmpotic, A., et al. (2006). The herpesviral Fc receptor fcr-1 down-regulates the NKG2D ligands MULT-1 and H60. *The Journal of experimental medicine*, 203(8), 1843-1850.
- Li, J., Rabinovich, B. A., Hurren, R., Shannon, J., & Miller, R. G. (2003). Expression cloning and function of the rat NK activating and inhibitory receptors NKR-P1A and -P1B. *Int. Immunol.*, 15, 411-416.
- Lodoen, M. B., & Lanier, L. (2005). Viral modulation of NK cell immunity. *Nature reviews. Microbiology*, 3(1), 59-69.
- Lodoen, M. B., & Lanier, L. L. (2006). Natural killer cells as an initial defense against pathogens. *Current opinion in immunology*, 18(4), 391-8.
- Lotze, M. T., Zeh, H. J., Rubartelli, A., Sparvero, L. J., Amoscato, A. A., Washburn, N. R., Devera, M. E., et al. (2007). The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. *Immunological reviews*, 220, 60-81.
- Marchler-Bauer, A., Lu, S., Anderson, J. B., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., Deweese-Scott, C., Fong, J. H., et al. (2010). CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic acids research*, 39(November 2010), 225-229.
- Matzinger, P. (2002). The danger model: a renewed sense of self. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5566), 301-305.
- McGeoch, D J, Dolan, A, & Ralph, A. C. (2000). Toward a comprehensive phylogeny for mammalian and avian herpesviruses. *Journal of virology*, 74(22), 10401-10406.
- McGeoch, Duncan J, Rixon, F. J., & Davison, A. J. (2006). Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus research*, 117(1), 90-104.
- McGregor, A., & Schleiss, M R. (2001). Molecular cloning of the guinea pig cytomegalovirus (GPCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome (BAC) in Escherichia coli. *Molecular genetics and metabolism*, 72(1), 15-26.
- McNab, a R., Desai, P., Person, S., Roof, L. L., Thomsen, D. R., Newcomb, W. W., Brown, J. C., et al. (1998). The product of the herpes simplex virus type 1 UL25 gene is required for encapsidation but not for cleavage of replicated viral DNA. *Journal of virology*, 72(2), 1060-1070.
- Meijer, H., Dormans, P. H., Geelen, J. L., & van Boven, C. P. (1984). Rat cytomegalovirus: studies on the viral genome and the proteins of virions and nucleocapsids. *The Journal of general virology*, 65 (Pt 4), 681-695.

- Meijer, H., Dreesen, J. C., & Van Boven, C. P. (1986). Molecular cloning and restriction endonuclease mapping of the rat cytomegalovirus genome. *The Journal of general virology*, 67 (Pt 7), 1327-1342.
- Mesci, Aruz, Ljusic, Belma, Makrigiannis, Andrew P, & Carlyle, James R. (2006). NKR-P1 biology: from prototype to missing self. *Immunologic research*, 35(1-2), 13-26.
- Messerle, M, Bühler, B., Keil, G M, & Koszinowski, U H. (1992). Structural organization, expression, and functional characterization of the murine cytomegalovirus immediate-early gene 3. *Journal of virology*, 66(1), 27-36.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(26), 14759-14763.
- Modrow, S., Falke, D., Schätzel, H., & Truyen, U. (2010). *Molekulare Virologie* (3rd ed., p. 734). Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg.
- Nagaike, K., Mori, Y., Gomi, Y., Yoshii, H., Takahashi, M., Wagner, Markus, Koszinowski, U., et al. (2004). Cloning of the varicella-zoster virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome in Escherichia coli. *Vaccine*, 22(29-30), 4069-4074.
- Neuwirth, A. (2005). Regulation des Zellzyklus durch das Maus- und Ratten-Zytomegalievirus. *Charité-Berlin*.
- Noda, S., Aguirre, S. A., Bitmansour, A., Brown, J. M., Sparer, T. E., Huang, J., & Mocarski, Edward S. (2006). Cytomegalovirus MCK-2 controls mobilization and recruitment of myeloid progenitor cells to facilitate dissemination. *Blood*, 107(1), 30-38.
- Obrig, T. G., Culp, W. J., McKeehan, W. L., & Hardesty, B. (1971). The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes. *The Journal of biological chemistry*, 246(1), 174-181.
- Oliveira, S. A., Park, S.-ho, Lee, P., Bendelac, A., & Shenk, T. E. (2002). Murine cytomegalovirus m02 gene family protects against natural killer cell-mediated immune surveillance. *Journal of virology*, 76(2), 885-894.
- Pellett, P. E., & Roizman, B. (2006). The Herpesviridae: A Brief Introduction. In B. N. Fields, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, S. E. Straus, et al. (Eds.), *Virology* (5th ed., pp. 2479-2772). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Powers, C., DeFilippis, V., Malouli, D., & Früh, K. (2008). Cytomegalovirus immune evasion. *Current topics in microbiology and immunology*, 325, 333-359.

- Priscott, P. K., & Tyrrell, D. A. (1982). The isolation and partial characterisation of a cytomegalovirus from the brown rat, *Rattus norvegicus*. *Archives of virology*, *73*(2), 145-160.
- Pyzik, M., Kielczewska, A., & Vidal, S. M. (2008). NK cell receptors and their MHC class I ligands in host response to cytomegalovirus: insights from the mouse genome. *Seminars in immunology*, *20*(6), 331-342.
- Pósfai, G., Plunkett, G., Fehér, T., Frisch, D., Keil, Günther M, Umenhoffer, K., Kolisnychenko, V., et al. (2006). Emergent properties of reduced-genome *Escherichia coli*. *Science (New York, N.Y.)*, *312*(5776), 1044-1046.
- Rawlinson, W. D., Farrell, H. E., & Barrell, B. G. (1996). Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus. *Journal of virology*, *70*(12), 8833-49.
- Reddehase, M. J. (2002). Antigens and immunoevasins: opponents in cytomegalovirus immune surveillance. *Nature reviews. Immunology*, *2*(11), 831-844.
- Reddehase, M. J., Grzimek, N. K. A., Seckert, C. K., & Simon, C. O. (2006). Murine Model of Cytomegalovirus Latency and Reactivation: the Silencing/Desilencing and Immune Sensing Hypothesis. In M. Reddehase (Ed.), *Cytomegaloviruses: Molecular Biology and Immunology* (pp. 483-499). Wymondham: Caister Academic Press.
- Reddehase, M. J., Podlech, J., & Grzimek, N. K. a. (2002). Mouse models of cytomegalovirus latency: overview. *Journal of clinical virology*, *25 Suppl 2*, S23-36.
- Redwood, A. J., Messerle, Martin, Harvey, N. L., Hardy, C. M., Koszinowski, Ulrich H, Lawson, Malcolm A, & Shellam, Geoffrey R. (2005). Use of a murine cytomegalovirus K181-derived bacterial artificial chromosome as a vaccine vector for immunocontraception. *Journal of virology*, *79*(5), 2998-3008.
- Reno, J. M., Lee, L. F., & Boezi, J. A. (1978). Inhibition of herpesvirus replication and herpesvirus-induced deoxyribonucleic acid polymerase by phosphonoformate. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *13*(2), 188-92.
- Roth, S. J., Höper, D., Beer, M., Feineis, S., Tischer, B. K., & Osterrieder, Nikolaus. (2011). Recovery of infectious virus from full-length cowpox virus (CPXV) DNA cloned as a bacterial artificial chromosome (BAC). *Veterinary research*, *42*(1), 3. BioMed Central Ltd.
- Rudolph, J., O'Callaghan, D. J., & Osterrieder, N. (2002). Cloning of the genomes of equine herpesvirus type 1 (EHV-1) strains KyA and racL11 as bacterial artificial chromosomes (BAC). *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health*, *49*(1), 31-6.
- Ryckman, B. J., Jarvis, M. A., Drummond, D. D., Nelson, J. A., & Johnson, D. C. (2006). Human cytomegalovirus entry into epithelial and endothelial cells

- depends on genes UL128 to UL150 and occurs by endocytosis and low-pH fusion. *Journal of virology*, 80(2), 710-22.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2000). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed., p. 2344). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez, V., Greis, K. D., Sztul, E., & Britt, W. J. (2000). Accumulation of virion tegument and envelope proteins in a stable cytoplasmic compartment during human cytomegalovirus replication: characterization of a potential site of virus assembly. *Journal of virology*, 74(2), 975-86.
- Sandford, G R, & Burns, W H. (1996). Rat cytomegalovirus has a unique immediate early gene enhancer. *Virology*, 222(2), 310-7.
- Sandford, G R, Ho, K., & Burns, W H. (1993). Characterization of the major locus of immediate-early genes of rat cytomegalovirus. *Journal of virology*, 67(7), 4093-103.
- Sandford, Gordon R, Schumacher, U., Ettinger, J., Brune, Wolfram, Hayward, G. S., Burns, William H, & Voigt, Sebastian. (2010). Deletion of the rat cytomegalovirus immediate-early 1 gene results in a virus capable of establishing latency, but with lower levels of acute virus replication and latency that compromise reactivation efficiency. *The Journal of general virology*, 91(Pt 3), 616-21.
- Shiratori, I., Yamaguchi, M., Suzukawa, M., Yamamoto, K., Lanier, L. L., Saito, T., & Arase, H. (2005). Down-regulation of basophil function by human CD200 and human herpesvirus-8 CD200. *Journal of immunology*, 175(7), 4441-9.
- Smith, L M, McWhorter, a R., Masters, L. L., Shellam, G R, & Redwood, a J. (2008). Laboratory strains of murine cytomegalovirus are genetically similar to but phenotypically distinct from wild strains of virus. *Journal of virology*, 82(13), 6689-6696.
- Smith, L M, Tonkin, J. N., Lawson, M A, & Shellam, G R. (2004). Isolates of cytomegalovirus (CMV) from the black rat *Rattus rattus* form a distinct group of rat CMV. *The Journal of general virology*, 85(Pt 5), 1313-1317.
- Smith, Lee M, Shellam, Geoffrey R, & Redwood, A. J. (2006). Genes of murine cytomegalovirus exist as a number of distinct genotypes. *Virology*, 352(2), 450-465.
- Stark, G. R., Kerr, I. M., Williams, B. R., Silverman, R. H., & Schreiber, R. D. (1998). How cells respond to interferons. *Annual review of biochemistry*, 67, 227-264.
- Stinski, M. F., & Isomura, H. (2008). Role of the cytomegalovirus major immediate early enhancer in acute infection and reactivation from latency. *Medical microbiology and immunology*, 197(2), 223-231.
- Strelow, D N, Kreklywich, C N, Andoh, T., Moses, a V., Dumortier, J., Smith, P. P., Defilippis, V, et al. (2008). The role of angiogenic and wound repair factors

- during CMV-accelerated transplant vascular sclerosis in rat cardiac transplants. *American journal of transplantation*, 8(2), 277-287.
- Streblow, Daniel N, van Cleef, K. W. R., Kreklywich, Craig N, Meyer, C., Smith, P., Defilippis, Victor, Grey, F., et al. (2007). Rat cytomegalovirus gene expression in cardiac allograft recipients is tissue specific and does not parallel the profiles detected in vitro. *Journal of virology*, 81(8), 3816-3826.
- Söderberg-Nauclér, C. (2006). Does cytomegalovirus play a causative role in the development of various inflammatory diseases and cancer? *Journal of internal medicine*, 259(3), 219-246.
- Tabeta, K., Georgel, P., Janssen, E., Du, X., Hoebe, K., Crozat, K., Mudd, S., et al. (2004). Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(10), 3516-3521.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, Masatoshi, & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular biology and evolution*.
- Teterina, A., Richter, D., Matuschka, F.-R., Ehlers, B., & Voigt, Sebastian. (2009). Identification of a novel betaherpesvirus in *Mus musculus*. *Virology journal*, 6, 225.
- Tischer, B. K., Kaufer, B. B., Sommer, M., Wussow, F., Arvin, A. M., & Osterrieder, Nikolaus. (2007). A self-excisable infectious bacterial artificial chromosome clone of varicella-zoster virus allows analysis of the essential tegument protein encoded by ORF9. *Journal of virology*, 81(23), 13200-13208.
- Tischer, B. K., Smith, G. A., & Osterrieder, Nikolaus. (2010). En passant mutagenesis: a two step markerless red recombination system. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 634, 421-430.
- Vidal, S., & Lanier, L. (2006). NK cell recognition of mouse cytomegalovirus-infected cells. *Current topics in microbiology and immunology*, 298, 183-206.
- Vieira, J., Farrell, H. E., Rawlinson, W. D., & Mocarski, E S. (1994). Genes in the HindIII J fragment of the murine cytomegalovirus genome are dispensable for growth in cultured cells: insertion mutagenesis with a lacZ/gpt cassette. *Journal of virology*, 68(8), 4837-4846.
- Vink, C, Beuken, E., & Bruggeman, C. A. (2000). Complete DNA sequence of the rat cytomegalovirus genome. *Journal of virology*, 74(16), 7656-7665.
- Vink, Cornelis, Beisser, Patrick S., & Bruggeman, C. a. (1999). Molecular Mimicry by Cytomegaloviruses. *Intervirology*, 42(5-6), 342-349.
- Voigt, S, Sandford, G R, Ding, L., & Burns, W H. (2001). Identification and characterization of a spliced C-type lectin-like gene encoded by rat cytomegalovirus. *Journal of virology*, 75(2), 603-611.

- Voigt, S, Sandford, Gordon R, Hayward, G. S., & Burns, William H. (2005). The English strain of rat cytomegalovirus (CMV) contains a novel captured CD200 (vOX2) gene and a spliced CC chemokine upstream from the major immediate-early region: further evidence for a separate evolutionary lineage from that of rat CMV Maastricht. *The Journal of general virology*, 86(Pt 2), 263-274.
- Voigt, Sebastian, Mesci, Aruz, Ettinger, J., Fine, J. H., Chen, P., Chou, W., & Carlyle, James R. (2007). Cytomegalovirus evasion of innate immunity by subversion of the NKR-P1B:Clr-b missing-self axis. *Immunity*, 26(5), 617-627.
- Vyas, J. M., Van Der Veen, A. G., & Ploegh, H. L. (2008). The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nature reviews. Immunology*, 8(8), 607-618.
- Wang, S., Zhao, Y., Leiby, M., & Zhu, J. (2009). A new positive/negative selection scheme for precise BAC recombineering. *Molecular biotechnology*, 42(1), 110-116.
- Warming, S., Costantino, N., Court, D. L., Jenkins, N. A., & Copeland, N. G. (2005). Simple and highly efficient BAC recombineering using galK selection. *Nucleic acids research*, 33(4), e36.
- Wills, M. R., Ashiru, O., Reeves, M. B., Okecha, G., Trowsdale, J., Tomasec, P., Wilkinson, G. W. G., et al. (2005). Human cytomegalovirus encodes an MHC class I-like molecule (UL142) that functions to inhibit NK cell lysis. *Journal of immunology*, 175(11), 7457-7465.
- Yokoyama, W M, & Plougastel, B. F. (2003). Immune functions encoded by the natural killer gene complex. *Nat. Rev. Immunol.*, 3, 304-316.
- Zhang, Y., Buchholz, F., Muyrers, J. P., & Stewart, A. F. (1998). A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nature genetics*, 20(2), 123-128.
- Zhou, F.-C., Zhang, Y.-J., Deng, J.-H., Wang, X.-P., Pan, H.-Y., Hettler, E., & Gao, S.-J. (2002). Efficient infection by a recombinant Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus cloned in a bacterial artificial chromosome: application for genetic analysis. *Journal of virology*, 76(12), 6185-6196.

9 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	mikro (10 ⁻⁶)
Acc.-No.	<i>Accession Number</i>
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
BAC	Bakterielles Artifizielles Chromosom
bzw.	beziehungsweise
Cam	Chloramphenicol
CCMV	Schimpansen-Cytomegalovirus
CDD	<i>Conserved Domain Database</i>
cDNS	<i>complementary DNS</i> (komplementäre DNS)
CHX	Cycloheximid
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalovirus
CPE	cytopathischer Effekt
Ct	<i>cycle threshold</i>
D	Dalton
d	Tage
d. h.	das heißt
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleintriphosphat
DR	<i>direct repeat</i> (Sequenzwiederholung gleicher Orientierung)
ds	<i>double stranded</i> (doppelsträngig)
E	<i>Delayed Early</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
egfp	<i>enhanced green fluorescent protein</i> (grün fluoreszierendes Protein)
et al.	und andere
F	Farad

FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
GPCMV	Meerschweinchen-Cytomegalovirus
h	Stunden
H₂O_{injekt}	Wasser zu medizinischen Injektionszwecken
H₂O_{PCR-GRADE}	HPLC gereinigtes Wasser für PCRs
hc	<i>high copy</i>
HCMV	Humanes Cytomegalovirus
HeBS	<i>HEPES buffered saline</i>
HeBs	<i>HEPES buffered saline</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HHV	Humanes Herpesvirus
HSV	Herpes-Simplex-Virus
ICTV	<i>International Comittee on Taxonomy of viruses</i>
IE	<i>Immediate Early</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IR	<i>inverted repeat</i> (Sequenzwiederholung entgegengesetzter Orientierung)
ISG	Interferon-stimulierte Gene
JTT	Jones-Taylor-Thornton-Modell zur Berechnung phylogenetischer Verwandtschaft von Proteinen
k	kilo (10 ³)
Kan	Kanamycin
kBp	Kilobasenpaare
KSHV	Kaposi-Sarkom-assoziiertes Herpesvirus
L	<i>Late</i>
l	Liter
LB-Medium	<i>lysogeny broth</i> -Medium
lc	<i>low copy</i>
LPS	Lipopolysaccharid
m	Meter
M	molar (Mol/Liter)
MCMV	murines Cytomegalovirus
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>

min	Minuten
ml	Milliliter
mock	unbehandelte Versuchsansätze/-tiere
moi	<i>multiplicity of infection</i>
n	nano (10^{-9})
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NKD	Versuchstiere, deren NK-Zellen depletiert wurden
NKR	NK-Zell Rezeptor
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
OD	Optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
PAA	Phosphonoessigsäure
PAMP	<i>pathogen associated pattern</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
pfu	<i>plaque forming unit</i> (Plaques bildende Einheit)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration der H^+ -Ionen in einer Lösung
qPCR	quantitative PCR
RCMV-E	Ratten-Cytomegalovirus, Isolat „England“
RCMV-E ΔBAC	RCMV-E BAC bzw. Virus, in welchem 8,8 kbp deletiert sind
RCMV-E ΔRCTL	RCTL deletiertes RCMV-E
RCMV-E BAC	Als BAC kloniertes RCMV-E
RCMV-E CRE	RCMV-E BAC, bei dem die BAC-Kassette wieder entfernt wurde
RCMV-E REV	RCMV-E Δ RCTL Virus, bei dem RCTL lokusgetreu wieder eingesetzt wurde
RCMV-E wt	RCMV-E Wildtyp Virus
RCMV-M	Ratten-Cytomegalovirus, Isolat Maastricht
RCTL	RCMV C-typ-Lektin-ähnliches Protein
REF	embryonale Rattenfibroblasten
RhCMV	Rhesusaffen-Cytomegalovirus
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Reverse Transkriptase

s	Sekunden
SD	Ratten des Auszuchtstamms Sprague Dawley
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
ss	<i>single stranded</i> (einzelsträngig)
Suc	Sucrose
THV	Tupaia Herpesvirus
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TM	Schmelztemperatur
U	<i>Unit</i> (Einheit für die Enzymaktivität)
üN	über Nacht
ÜS	Überstand
UND	Versuchstiere, deren NK-Zellen nicht depletiert wurden
UV	Ultraviolett
V	Volt
VSB	<i>Virus Storage Buffer</i>
WAG	Ratten des Inzuchtstamms WAG
WT	Wildtyp
X-Gal	Brom-Chloro-Indolyl-Galactopyranosid
z. B.	zum Beispiel

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau eines Herpesvirions	1
Abbildung 2: Missing-self Aktivierung von NK-Zellen.....	8
Abbildung 3: Schema der RecA-vermittelten Rekombination in <i>E.coli</i>	21
Abbildung 4: G+C-Gehalt und <i>HindIII</i> -Restriktionskarte des gesamten RCMV-E Genoms	42
Abbildung 5: Schematische ORF-Karte des RCMV-E-Genoms.....	49
Abbildung 6: Graphische Darstellung der Genkarten von MCMV, RCMV-E und RCMV-M.	54
Abbildung 7: Phylogenetische Analysen konservierter CMV-Gene.....	62
Abbildung 8: Gegenüberstellung des Genaufbaus von RCTL und dessen Homologen.....	64
Abbildung 9: Quantitative Bestimmung der Expression von RCTL, rClr-b und dem Kontroll-Lektin CLEC2D5 nach Infektion von REFs mit den Viren RCMV-E wt, RCMV-E Δ RCTL und RCMV-E REV	65
Abbildung 10: Eingruppierung von RCTL als Early-Gen.....	67
Abbildung 11: Titerbestimmung der WAG Ratten mittels Plaque-Assay und qPCR	69
Abbildung 12: Titerbestimmung der SD-Ratten mittels Plaque-Assay und qPCR.	70
Abbildung 13: Schematische Darstellung der Klonierung der BAC-Kassette in das RCMV-E Genom	72
Abbildung 14: Plaquemorphologie unterschiedlicher RCMV-E Varianten	73
Abbildung 15: Wachstumskurven der Viren RCMV-E wt, RCMV-E BAC und RCMV-E CRE im Vergleich.....	74

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht humanpathogener Vertreter der Herpesviridae modifiziert nach Modrow et al. (Modrow et al., 2010).....	2
Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme	13
Tabelle 3: Bakterielle Nährmedien	13
Tabelle 4: Plasmide.....	13
Tabelle 5: RCMV-E Varianten und BACs	14
Tabelle 6: Antibiotika zu Selektion von Bakterien und als Zellkultursupplement ...	14
Tabelle 7: Antikörper zu NK-Zell-Depletion	14
Tabelle 8: Kommerzielle Kits.....	14
Tabelle 9: Verwendete Enzyme	14
Tabelle 10: Chemikalien, die nicht von Carl Roth, Sigma-Aldrich oder Applichem bezogen wurden.....	15
Tabelle 11: Verwendete Primer zur PCR-Amplifikation Sequenzierung und Mutagenese	16
Tabelle 12: Selbst hergestellte Puffer und Lösungen	16
Tabelle 13: Verbrauchsmaterialien.....	17
Tabelle 14: Verwendete Geräte	18
Tabelle 15: Verwendete Programme.....	18
Tabelle 16: Exemplarisches Pipettierschema einer PCR.....	24
Tabelle 17: Temperaturprofil der Klonierungs- und Nachweis-PCRs.....	24
Tabelle 18: Temperaturprofil der Quickchange-PCR.....	25
Tabelle 19: Pipettierschema und PCR-Protokoll einer reversen Transkription.....	25
Tabelle 20: Pipettierschema einer Sequenzierungs-PCR.....	26
Tabelle 21: Temperaturprofil einer Sequenzierungs-PCR	26
Tabelle 22: PCR-Protokoll der Termini-PCR	27
Tabelle 23: Pipettierschema des Reaktionsansatzes je qPCR	28
Tabelle 24: Temperaturprofil der qPCRs	28
Tabelle 25: TOPO TA Klonierungsansatz.....	30
Tabelle 26: Übersicht der Meßzeitpunkte der Wachstumskurven	35
Tabelle 27: Einteilung der Tiere in Versuchsgruppen	37
Tabelle 28: Zusammenstellung der für die phylogenetische Eingruppierung verwendeten Viren und Proteine inklusive der GenBank Acc.-No.....	40

Tabelle 29: Zusammenstellung der repetitiven Elemente	43
Tabelle 30: Zusammenfassung der ORF Analysen mittels BlastX.....	44
Tabelle 31: Übersicht der gespleißten Gene in RCMV-E.....	47
Tabelle 32: Vergleich der ORFs von RCMV-E, RCMV-M und MCMV Smith	50

12 Publikationen

Voigt S, Mesci A, **Etinger J**, Fine JH, Chen P, Chou W, and Carlyle JR. 2007. Cytomegalovirus evasion of innate immunity by subversion of the NKR-P1B:Clr-b missing-self axis. *Immunity* 26:617-627.

Sandford GR, Schumacher U, **Etinger J**, Brune W, Hayward GS, Burns WH, and Voigt S. 2010. Deletion of the rat cytomegalovirus immediate-early 1 gene results in a virus capable of establishing latency, but with lower levels of acute virus replication and latency that compromise reactivation efficiency. *Journal of general Virology* 91:616-621.

13 Danksagung

Allen voran möchte ich Herrn PD Dr. med. Sebastian Voigt für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung während der gesamten Promotion danken.

Bei Herrn PD Dr. med. Wolfram Brune möchte ich mich für die Bereitstellung aller benötigten Materialien und die hilfreichen Diskussionen und Hinweise danken.

Frau PD Dr. Annette Mankertz und Herrn Prof. Dr. Rupert Mutzel danke ich für die Übernahme der Gutachten.

Dr. Karsten Tischer danke ich für die hilfreichen und motivierenden Tipps, als ich mit meinem Latein am Ende war und für die Unterstützung bei der Entwicklung der neuen Klonierungsstrategie für den neuen BAC.

Meinen Kollegen danke ich für die stets freundschaftliche und verständnisvolle Arbeitsatmosphäre. In einem solchen Umfeld lässt sich gut promovieren. Ich hoffe wir bleiben in Kontakt. Besonderer Dank gilt hier unserer ehemaligen technischen Assistentin Conny Hasselberg-Christoph, die mich nicht nur bei der täglichen Laborarbeit und der Etablierung von Protokollen unterstützt hat, sondern mir auch eine sehr große Hilfe in der Eingewöhnungsphase in Berlin war.

David Feist und Anke Edelmann danke ich für ihre Bereitschaft auch noch kurz vor Abgabe die Arbeit noch einmal zu korregieren.

Meinen Eltern und meiner Familie möchte ich ganz besonders danken. Ihr habt stets an mich geglaubt und mich immer unterstützt. Leider konnte ich euch viel zu selten besuchen.

Meiner Lebensgefährtin Chantale danke ich für ihr grenzenloses Verständnis in all den Jahren und ihre Fähigkeit, mich in den rechten Momenten geradezurücken. Ohne deine Hilfe wäre diese Arbeit möglicherweise nie fertig geworden

Zu guter Letzt möchte ich allen danken, die mir die letzten fünf Jahre hier in Berlin gute Freunde waren und mir fernab der bayerischen Berge das Gefühl gegeben haben, zu Hause zu sein.

Falls ich irgendjemanden persönlich nicht angesprochen habe und er seinen Namen hier vermisst: Auch Dir ein großes und dickes: DANKE

14 Eidesstattliche Erklärung

Eidesstattliche Erklärung:

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit von mir selbst und ohne fremde Hilfe verfasst und noch nicht anderweitig für Prüfungszwecke vorgelegt wurde.

Es wurden keine anderen als die angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt. Wörtliche und sinngemäße Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Berlin, den 28.07.2011