

# Molekulare Grundlagen der Spezies-Spezifität bei Zytomegalieviren

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

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

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Uwe Schumacher

aus Alzey

Januar 2010

*„Holzhacken ist deshalb so beliebt,  
weil man bei dieser Tätigkeit den Erfolg sofort sieht.“*

**Albert Einstein**

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

1. Gutachter: Prof. Dr. R. Mutzel

2. Gutachter: PD Dr. A. Mankertz

Disputation am 26.3.2010

## Zusammenfassung

Zytomegalieviren (CMV) gehören zur Unterfamilie der  $\beta$ -Herpesviren, die als strikt speziesspezifisch angesehen werden. Spezies-Spezifität heißt, dass eine permissive Infektion nur in Zellen der eigenen Art oder sehr nah verwandter Arten etabliert werden kann. Deshalb kann das humane CMV (HCMV) nicht in murinen Zellen replizieren, und umgekehrt ist es dem murinen CMV (MCMV) in humanen Zellen nicht möglich, Virusnachkommen zu bilden. Die genauen molekularen Ursachen dieser Spezies-Spezifität sind bisher weitestgehend unbekannt. In einer neueren Studie konnte gezeigt werden, dass die Infektion humaner Zellen mit MCMV zur Induktion verschiedener apoptotischer Signalwege führt, die letztlich zum Tod der Zelle führen. Wenn diese Signalwege durch die Expression antiapoptotischer Proteine blockiert sind, ist MCMV in der Lage, in humanen Zellen eine permissive Infektion zu etablieren, wenn auch mit geringerer Effizienz.

In dieser Arbeit wird die Isolierung und phänotypische Charakterisierung einer spontan entstandenen MCMV Mutante beschrieben, die in der Lage ist, in humanen Zellen schnell und mit hoher Effizienz zu replizieren. In speziessfremden humanen Zellen induziert diese spontane Mutante weniger Apoptose im Vergleich zum parentalen MCMV und zerstört effizienter ND10 Strukturen, die als Teil des intrazellulären Abwehrsystems angesehen werden. Die Ausbildung der viralen DNA-Replikationszentren ist nach Infektion humaner Zellen mit dieser Mutante ebenfalls deutlich verstärkt. Durch Genomsequenzierung wurden verschiedene Mutationen in diesem adaptierten Virus entdeckt. Mit Hilfe zielgerichteter Mutagenese konnte gezeigt werden, dass die Mutationen in der Genregion M112/113 einen deutlichen Einfluss ausüben, da der Einbau dieser Mutationen in MCMV ausreichend war, um eine lytische Infektion in humanen Zellen zu etablieren. In dieser zu HCMV UL112/113 homologen Genregion sind die „early-1“ (E1) Proteine kodiert, und es ist bekannt, dass diese eine wichtige Rolle bei der DNA-Replikation spielen. Allerdings zeigte sich auch, dass diese Mutationen alleine nicht ausreichend sind, um den bemerkenswerten Phänotypen der adaptierten Virusmutante zu reproduzieren, da die konstruierte M112/113 Mutante weniger Virusnachkommen bildete und dies zusätzlich mit einer deutlich verzögerten Kinetik. Es muss also noch weitere Mutationen geben, die den Phänotyp des adaptierten Virus in humanen Zellen mitverursachen. Die hier gewonnenen Erkenntnisse tragen dazu bei, die molekularen Ursachen der Spezies-Spezifität bei CMV verstehen zu lernen und helfen möglicherweise eines Tages dabei, den Aufbau eines *in vivo* HCMV Tiermodells in der Maus zu etablieren.

## Summary

Cytomegaloviruses, representatives of the *Betaherpesvirinae*, are highly species specific. Permissive infections are only possible in cells of their own or of closely related species. Therefore, human cytomegalovirus (HCMV) does not replicate in mouse cells, and mouse cytomegalovirus (MCMV) does not produce new virus particles in human cells. The underlying molecular mechanisms of the cytomegalovirus species specificity are so far poorly understood. Recently, it was shown that infection of human cells with MCMV leads to the induction of apoptotic pathways and finally to cell death. Blocking this pathways by expression of anti-apoptotic proteins enables MCMV to replicate in human cells and to set up a permissive infection.

In the present study we describe the isolation and characterization of a spontaneously adapted MCMV mutant that has gained the ability to replicate rapidly in human cells and production of new virus particles is highly efficient. Induction of apoptosis in human cells after infection is less pronounced compared to parental MCMV and the mutant MCMV disrupts ND10 structures, a part of the intrinsic immune defense, more efficiently. This mutant virus also forms larger nuclear replication compartments and replicates DNA more efficiently as compared to the parental MCMV. A genome-wide sequence analysis revealed several genetic alterations within this mutant. Site-directed mutagenesis approaches showed that mutations in the M112/113 gene region are involved in this phenotype, since introduction of these mutations into MCMV was sufficient to establish a lytic permissive infection in human cells. M112/113 is the homologous region to HCMV UL112/113 and this region encodes the viral early-1 (E1) proteins which play an important role in DNA replication and formation of replication compartments within the nucleus. However, these mutations did not fully restore the remarkable phenotype of the adapted virus, because the constructed M112/113 virus produced less viral progeny after a delayed onset of viral spread. Therefore it seems likely that additional mutations so far not detected contribute as well. These results contribute to a better understanding of the molecular mechanisms underlying the cytomegalovirus species specificity in general and might help to construct an *in vivo* HCMV model in mice one day.

# Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG .....	III
SUMMARY .....	IV
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Viren und Virusklassifizierung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Herpesviren.....</b>	<b>1</b>
<b>1.3 Zytomegalieviren (CMV) .....</b>	<b>3</b>
1.3.1 Aufbau und Struktur .....	3
1.3.2 Epidemiologie und Pathogenese.....	4
<b>1.4 Genexpression und DNA-Replikation .....</b>	<b>5</b>
<b>1.5 Virus-Wirt-Interaktionen.....</b>	<b>7</b>
<b>1.6 Virale Spezies-Spezifität .....</b>	<b>10</b>
1.6.1 Virale Spezies-Spezifität im Allgemeinen .....	10
1.6.2 Spezies-Spezifität bei CMV.....	12
<b>1.7 Zielsetzung dieser Arbeit.....</b>	<b>14</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Material .....</b>	<b>15</b>
2.1.1 Zelllinien und Zellkulturmedium .....	15
2.1.2 Viren.....	15
2.1.3 Bakterien und Bakterienkulturmedium .....	16
2.1.4 Antibiotika.....	17
2.1.5 Plasmide.....	17
2.1.6 Oligonukleotide.....	19
2.1.7 Größenstandards .....	22
2.1.8 Enzyme .....	22
2.1.9 Kits.....	22
2.1.10 Primärantikörper .....	23
2.1.11 Sekundärantikörper.....	23
2.1.12 Chemikalien .....	24
2.1.13 Puffer und Lösungen .....	24
2.1.14 Verbrauchsmaterialien .....	25
2.1.15 Geräte.....	26

<b>2.2 Methoden</b> .....	<b>27</b>
2.2.1 Zellkulturmethoden und Virusanzucht .....	27
2.2.1.1 Kultivierung von Zellen .....	27
2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	27
2.2.1.3 Virusrekonstitution durch Transfektion von BAC-DNA mit Polyfect .....	27
2.2.1.4 Virusanzucht aus Virusüberstand.....	28
2.2.1.5 Virustitration zur Bestimmung der TCID <sub>50</sub> /ml und Virusinfektion von Zellen .....	28
2.2.1.6 Wachstumskinetiken .....	29
2.2.1.7 Herstellung von Retroviren und Generierung von stabilen „knock-down“ Zelllinien .....	30
2.2.1.8 MTT-Vitalitäts-Assay.....	31
2.2.2 Molekulare Methoden .....	31
2.2.2.1 Isolierung genomischer DNA mittels Phenol/Choloroform Extraktion .....	31
2.2.2.2 Isolierung von Plasmid- und BAC-DNA mittels alkalischer Lyse („Mini“).....	32
2.2.2.3 Isolierung von Plasmid- und BAC-DNA („Midi“ bzw. „Maxi“).....	33
2.2.2.4 Bestimmung der DNA Menge.....	33
2.2.2.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und Sequenzierung .....	33
2.2.2.6 RealTime-PCR Analysen .....	34
2.2.2.7 DNA Gelelektrophorese und BAC-Gele .....	35
2.2.2.8 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel bzw. einer PCR .....	36
2.2.2.9 Restriktionsverdau und Ligation.....	36
2.2.2.10 Herstellung elektrokompenter Bakterien .....	36
2.2.2.11 Herstellung rekombinationskompetenter Zellen .....	37
2.2.2.12 Lagerung von Bakterienkulturen (Stammsammlung).....	37
2.2.2.13 Elektroporation.....	37
2.2.2.14 MCMV-BAC Mutagenese .....	38
2.2.2.15 Gezielter Einbau von Punktmutationen mit Hilfe der „Quikchange PCR“ .....	43
2.2.2.16 „Southern Slot Blot“ .....	43
2.2.3 Proteinbiochemische und immunologische Methoden.....	44
2.2.3.1 Herstellung von Zelllysaten und Bestimmung der Proteinmenge .....	44
2.2.3.2 SDS-PAGE und Western Blot .....	45
2.2.3.3 Immunfluoreszenz .....	46
2.2.3.4 TUNEL-Assay.....	46
<b>3 ERGEBNISSE</b> .....	<b>48</b>
<b>3.1 Isolierung von MCMV/h</b> .....	<b>48</b>
<b>3.2 Phänotypische Charakterisierung von MCMV/h</b> .....	<b>50</b>
3.2.1 Untersuchungen zur Apoptoseinduktion .....	50
3.2.2 Analyse der Wachstumskinetiken in humanen Zellen .....	51

3.2.3	Genexpressionskinetik in speziesfremden Zellen .....	53
3.2.4	DNA-Replikation in humanen RPE-1 Zellen.....	55
<b>3.3</b>	<b>Genomanalyse von MCMV/h .....</b>	<b>57</b>
3.3.1	Virion-DNA-Verdau .....	57
3.3.2	Genomsequenzierung und Analyse .....	60
<b>3.4</b>	<b>Einbau der gefundenen Mutationen mittels BAC-Mutagenese in MCMV/wt .....</b>	<b>62</b>
3.4.1	Untersuchungen zum Einfluss der Mutationen in M112 .....	62
3.4.2	Untersuchungen zum Einfluss der Mutationen in M116 .....	66
3.4.3	Untersuchungen zum Einfluss der Mutationen in m108 .....	68
3.4.4	Untersuchungen zum Einfluss des genetischen Rearrangements m09-m18.....	69
3.4.5	Zusammenfassung der Genomanalyse .....	70
<b>3.5</b>	<b>Einzelmutationsanalyse in M112/113 .....</b>	<b>71</b>
<b>3.6</b>	<b>Expressionskinetikanalyse IE3 und E1 .....</b>	<b>74</b>
<b>3.7</b>	<b>Untersuchungen zur Formation der Replikationskompartimente .....</b>	<b>77</b>
<b>3.8</b>	<b>Untersuchungen zum Aufbau der Replikationskompartimente.....</b>	<b>79</b>
<b>3.9</b>	<b>Einfluss der Replikation auf die ND10 Strukturen.....</b>	<b>81</b>
<b>3.10</b>	<b>Einfluss der ND10 Proteine PML und Daxx.....</b>	<b>87</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>90</b>
4.1	Zytomegalieviren: Infektionen und Adaptation an neue Wirtsorganismen .....	90
4.2	Apoptoseinduktion von MCMV in humanen Zellen .....	91
4.3	DNA-Replikation von MCMV/h in humanen Zellen .....	94
4.4	Rolle der ND10 in der speziesfremden Infektion .....	98
4.5	Spezies-Spezifität von MCMV/h <i>in vivo</i> .....	103
4.6	Schlussfolgerung .....	104
<b>5</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>106</b>
	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>119</b>
	<b>CURRICULUM VITAE.....</b>	<b>121</b>
	<b>PRÄSENTATIONEN UND KONGRESSBESUCHE .....</b>	<b>122</b>
	<b>PUBLIKATIONEN .....</b>	<b>123</b>
	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>124</b>
	<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>125</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Viren und Virusklassifizierung

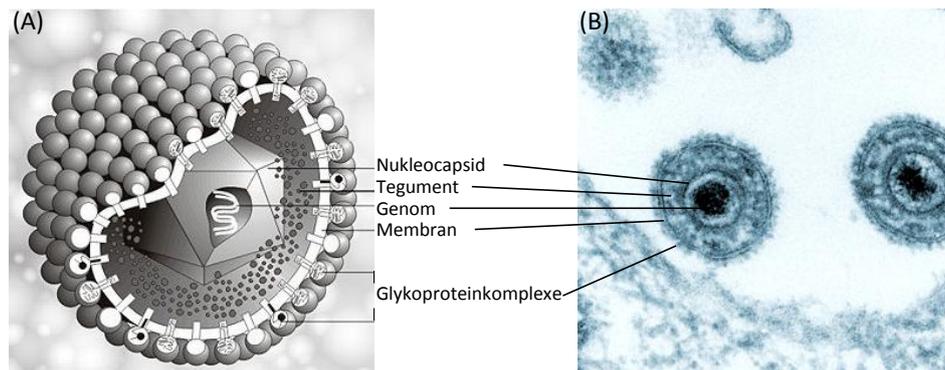
Viren sind winzige obligate Zellparasiten, die zum Ablauf ihres Lebenszykluses auf lebende Wirtszellen angewiesen sind. Nach deren Infektion nutzen die Viren die komplette Transkriptions- und Translationsmaschinerie der Wirtszelle aus, um virale Proteine und letztlich Virusnachkommen bilden zu können. Die Viruspartikel selbst, die so genannten Virionen, bestehen im Grunde nur aus der Genominformation, die von einer Proteinhülle (Kapsid) umgeben ist und optional einer äußeren Lipidmembran, die das Kapsid umschließt (Modrow et al. 2003).

Wirtszellen können pflanzlicher oder tierischer Natur sein oder aber auch einfache Bakterienzellen darstellen. Dementsprechend unterscheiden sich die jeweiligen Virionpartikel im Aufbau des Kapsids, dem Träger der Erbinformation (DNA/RNA) oder dem Vorhandensein einer Lipidmembran deutlich voneinander (Modrow et al. 2003, Condit 2001).

## 1.2 Herpesviren

Die Familie der *Herpesviridae* besteht aus Viren, die sich durch den Besitz eines doppelsträngigen linearen DNA-Genoms mit einer variablen Genomgröße zwischen 124 - 230 kb und einem ikosaedrischen Kapsid mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 125 nm auszeichnen. Zusätzlich besitzen die Mitglieder dieser Virusfamilie eine Lipidhülle, die virale Glykoproteine enthält und die das Kapsid umschließt. Zwischen Kapsid und Hüllmembran befindet sich das so genannte Tegument, ein Raum in dem wichtige Proteine, RNA oder Zellbestandteile transportiert werden können (Modrow et al. 2003, Mocarski et al. 2007) (Abbildung 1). Nach Infektion der Wirtszelle wird der Tegumentinhalt ins Cytoplasma entleert und die Proteine nehmen dort ihre Aufgaben wahr (Kalejta 2008).

Ein weiteres wichtiges Definitionskriterium ist die Fähigkeit aller Herpesviren nach einer Primärinfektion in den Status der Latenz gehen zu können. Darunter versteht man ein Stadium, in dem die Infektion zwar immer noch vorliegt, aber dennoch keine klinischen Symptome mehr verursacht. Somit kann eine zeitlich unbegrenzte lebenslang persistierende Infektion etablieren werden. Latent infizierte Zellen können durch Reaktivierung wieder Viruspartikel produzieren und somit erneut eine klinische Manifestation des Krankheitsbildes auslösen (Jarvis und Nelson 2002, Sinclair 2008, Sinclair und Sissons 2006, Sissons et al. 2002). Eine produktive Virusreplikation in infizierten Zellen führt letztlich dazu, dass diese nach einem gewissen Zeitraum zerstört wird (Mocarski et al. 2007).



**Abbildung 1: Typischer Aufbau der Herpesviren.** (A) Schematischer Querschnitt durch die äußere Hüllmembran und das Kapsid eines Viruspartikels (<http://biografix.de/>). (B) Elektronenmikroskopische Aufnahme des humanen Zytomegalievirus, dem Prototypen der  $\beta$ -Herpesviren ([http://www.frauenaerzte-im-netz.de/de\\_cytomegalie-cytomegalie\\_1100.html](http://www.frauenaerzte-im-netz.de/de_cytomegalie-cytomegalie_1100.html)).

Durch Sequenzanalysen konnte bestätigt werden, dass die Evolution der Herpesviren vor circa 180 - 200 Millionen Jahren begann und diese sich letztlich mit der weiteren Evolution des jeweiligen Wirtes parallel vollzog (McGeoch et al. 2006, McGeoch et al. 1995). Diese Co-Evolution führte zu einer perfekten Anpassung des Virus an den jeweiligen Wirt und führte schließlich dazu, dass heutzutage Herpesviren bei Säugetieren, Vögeln, Reptilien und sogar bei Fischen und Invertebraten gefunden wurden (Davison et al. 2005, Hedrick et al. 2000).

Aufgrund der verschiedenen biologischen Merkmale wie Pathogenität, Spezies-Spezifität, Replikationsverhalten und Zelltropismus, lassen sich die Mitglieder der *Herpesviridae* in drei Unterfamilien aufteilen: Alpha/ $\alpha$ -, Beta/ $\beta$  und Gamma/ $\gamma$ -*Herpesvirinae* (McGeoch et al. 2006). Eine Übersicht dieser Unterfamilien mit ihren jeweiligen humanpathogenen Vertretern ist in Tabelle 1 zusammengestellt.

Die Vertreter der  $\alpha$ -*Herpesvirinae* besitzen ein relativ breites Wirtszellspektrum, einen schnellen Replikationszyklus und ein schnelles Wachstum *in vitro* in Zellkultur mit einer sehr effizienten Zerstörung der Wirtszellen. Diese Viren persistieren *in vivo* hauptsächlich in den sensorischen Ganglien (Roizman und Pellet 2001, Modrow et al. 2003).

Ein charakteristisches Merkmal der  $\beta$ -*Herpesvirinae* ist ihre stark ausgeprägte Spezies-Spezifität. Das heißt, sie besitzen ein sehr enges Wirtszellspektrum und replizieren nur in Zellen der eigenen oder einer nah verwandten Art. Zusätzlich sind sie durch einen langen Replikationszyklus gekennzeichnet, wodurch sie sich *in vitro* nur sehr langsam ausbreiten. Im Falle der Zytomegalieviren erkennt man infizierte Zellen an ihrem typischen vergrößerten Erscheinungsbild (Zytomegalie). Persistierende Viren findet man in Speicheldrüsen und lymphatischen Organen, aber auch in der Niere und anderem Gewebe (Roizman und Pellet 2001, Modrow et al. 2003).

Die Vertreter der  $\gamma$ -*Herpesvirinae* zeigen ebenfalls ein limitiertes Wirtsspektrum, wobei die Replikationsdauer unterschiedlich ist. *In vitro* replizieren sie in lymphoblastoiden Zellen und Viruslatenz manifestiert sich entweder in B-Lymphozyten (Epstein-Barr-Virus) oder T-Zellen. Lytische Infektionen können von einigen Vertretern dieser Unterfamilie in Epithel-, Endothel- oder Fibroblastenzellen etabliert werden (Roizman und Pellet 2001, Modrow 2003).

**Tabelle 1: Unterfamilien der *Herpesviridae* mit den jeweils humanpathogenen Vertretern (nach Modrow et al, 2003).** Bei der Angabe der Virusnamen wurden der gebräuchliche Name und der systematische Name (in Klammern) angegeben.

Unterfamilien der <i>Herpesviridae</i>	Genus	Humanpathogen <sup>a</sup>	Erkrankung
$\alpha$	Simplexvirus	Herpes-simplex-Virus/HSV-1 (HHV-1)	Lippenherpes ( <i>Herpes labialis</i> )
		Herpes-simplex-Virus/HSV-2 (HHV-2)	Genitalherpes ( <i>Herpes genitalis</i> )
	Varicellovirus	Varicella-Zoster-Virus/VZV (HHV-3)	Windpocken bzw. Gürtelrose
$\beta$	Cytomegalovirus	humanes Zytomegalievirus/HCMV (HHV-5)	CMV-Mononukleose; bei Immunsuppression u.a. Retinitis, Pneumonie, Enzephalie; oft tödlich; kongenitale Infektion mit variierender Symptomatik
	Roseolovirus	HHV-6 HHV-7	Drei-Tage-Fieber ( <i>Exanthema subitum</i> )
$\gamma$	Lymphocryptovirus	Epstein-Barr-Virus/EBV (HHV-4)	Pfeiffer-Drüsenfieber, Burkitt-Lymphom bei Immunsuppression, Nasopharynxkarzinom
	Rhadinovirus	Kaposi-Sarkoma-assoziiertes Herpesvirus/KSHV (HHV-8)	Kaposi-Sarkom und seltene maligne Lymphome, primäres Effusionslymphom, multizentrische Castleman-Erkrankung

<sup>a</sup> HHV, humanes Herpesvirus

### 1.3 Zytomegalieviren (CMV)

#### 1.3.1 Aufbau und Struktur

Das humane Zytomegalievirus (HCMV) stellt zusammen mit dem homologen Vertreter in der Maus, dem murinen Zytomegalievirus (MCMV), den Prototypen der  $\beta$ -Herpesviren dar. Beide besitzen den typischen Herpesvirusaufbau und den ebenfalls typischen langsamen Replikationszyklus von circa 48 bis 72 h für HCMV bzw. circa 24 h im Falle von MCMV. Die Genome beider Viren sind ungefähr 220 - 230 kb groß und besitzen die Kapazität je nach Vorhersage 160 - 200 Gene zu codieren, wobei durch verbesserte Methoden die Vorhersage neuer zusätzliche Gene ermöglicht wurde (Brocchieri et al. 2005, Dolan et al. 2004, Murphy et al. 2003). Das Viruskapsid ist 125 nm gross und wird von einer unregelmäßig geformten

---

Hüllmembran umgeben, wodurch der Viruspartikeldurchmesser zwischen 200 - 300 nm schwank (Mocarski et al. 2007). HCMV und MCMV etablieren nach einer Erstinfektion die typische lebenslange persistierende Infektion im Wirtsorganismus und können so, je nach Immunstatus des Wirtes, reaktiviert werden (Jarvis und Nelson 2002, Sinclair und Sissons 2006). Beide Viren sind sehr speziesspezifisch und replizieren daher nur in Zellen der eigenen oder nah verwandten Arten. Aufgrund dieser Speziesbarriere ist es nicht möglich, eine HCMV-Infektion in einem Tiermodell zu untersuchen. Das mit HCMV verwandte murine CMV dient deshalb als Modellsystem, da sich MCMV in Bezug auf Pathogenese, Immunmodulation und Latenz ähnlich wie HCMV verhält. Hierfür existiert mit der Maus außerdem ein kostengünstiges und sehr gut etabliertes Tiermodell, mit dessen Hilfe sich *in vivo* Experimente durchführen lassen.

### **1.3.2 Epidemiologie und Pathogenese**

Das humane Zytomeglievirus ist ein sehr weit verbreiteter opportunistischer Krankheitserreger. Je nach statistischer Erhebung schwank die weltweite Durchseuchungsrate in der Bevölkerung zwischen 70 % bis nahezu 100 %, wobei die Rate in Deutschland bei circa 50 % liegt (Söderberg-Naucler 2006). Infektionen finden hauptsächlich über sexuelle Kontakte durch Körperflüssigkeiten wie Blut, Urin, Speichel und Genitalsekrete statt, aber auch kongenital in der Gebärmutter, während der Geburt oder später über die Muttermilch (Landolfo et al. 2003).

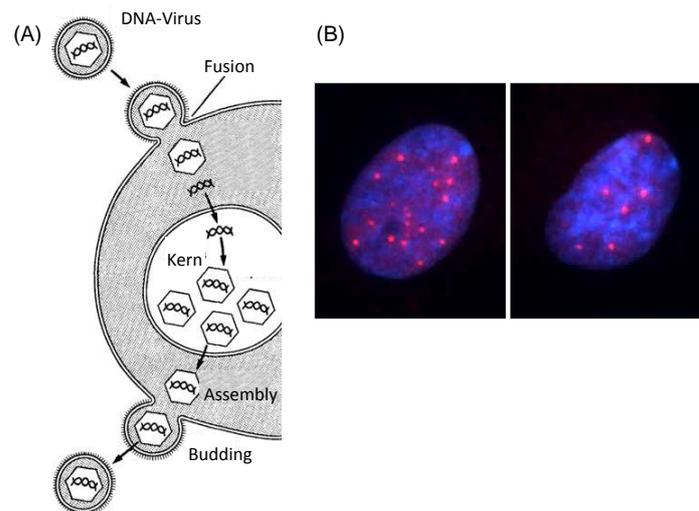
Eine Primärinfektion kann mit einer infektiösen Mononukleose einhergehen und wurde auch schon mit kardiovaskulären Erkrankungen wie z.B. Atherosklerose in Verbindung gebracht (Cheng et al. 2009, Nerheim et al. 2004), verläuft aber in gesunden immunkompetenten Personen meist asymptomatisch (Britt 2008). Die Infektion kann hierbei über das Immunsystem in Schach gehalten werden und das Virus an einer zu starken Ausbreitung hindern. Die klinische Relevanz einer CMV Infektion tritt meist nur in immunsupprimierten Individuen zutage (Landolfo et al. 2003). Hierzu gehören Patienten, die an dem „erworbenen Immundefektsyndrom“ (AIDS) leiden, denn deren Immunsystem ist durch die Infektion mit dem „Humanen Immundefizienz Virus“ (HIV) stark vermindert bzw. zerstört. Solche Patienten bilden häufig gastrointestinale Erkrankungen aus, aber auch Retinitiden, Pneumonien und schwere Enzephalitiden (Cheung und Teich 1999, Danner 1995). Die Inzidenz dieser opportunistischen CMV-Infektionen lag früher mit circa 40 % aller HIV-positiven Patienten sehr hoch, ist aber mit dem Auftreten besserer Therapiemöglichkeiten stark rückläufig. (Kedhar und Jabs 2007, Steininger et al. 2006). Auch Patienten deren

Immunsystem im Zuge einer Organ- oder Knochenmarkstransplantation supprimiert ist, um so Abstoßungsreaktionen des transplantierten Gewebes zu vermeiden, sind gefährdet durch eine CMV-Infektion oder eine Reaktivierung Hepatitiden oder Pneumonien auszubilden, insbesondere wenn ein seropositives Organ in einen seronegativen Empfänger transplantiert wurde (Arthurs et al. 2007, Razonable 2008, Reddy et al. 1999). Die dritte Risikogruppe für eine CMV-Infektion stellen schwangere Frauen und deren ungeborene/neugeborene Kinder über eine kongenitale Infektion dar. HCMV kann über die Plazenta in der schwangeren Frau auf das ungeborene Kind übertragen werden (Maidji et al. 2007). Kongenitale Infektionen können eine Schädigung bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems verursachen und folglich leiden die Kinder postnatal oftmals an den Folgen dieser Schädigungen. Hierbei variieren die Symptome stark und reichen von Hörverlust bis hin zu starker geistiger Retardierung (Cheeran et al. 2009, Malm und Engman 2007). In schweren Fällen kann eine kongenitale Infektion auch tödlich enden (Gandhi und Khanna 2004, Landolfo et al. 2003). Die Übertragungsrate seropositiver Mütter auf ihr ungeborenes beträgt europaweit circa 1,4 % und die Gefahr seronegativer Mütter während der Schwangerschaft eine Primärinfektion zu durchlaufen beträgt circa 1 - 8 %, wobei die Übertragung auf Ungeborene hierbei mit einer Rate von 32 % deutlich erhöht ist (Ludwig und Hengel 2009). 10 bis 20 % dieser Infektionen verlaufen lethal und die Gefahr, ausgehend von dieser Infektion sensorische Schäden davonzutragen, schwankt je nach Gruppe zwischen 8 bis 58 % (Ludwig und Hengel 2009).

#### **1.4 Genexpression und DNA-Replikation**

Der Replikationszyklus der Zytomegalieviren beginnt mit dem Anheften des Viruspartikels an die Wirtszelloberfläche und mit dem Eindringen in die Zelle. Dieser Vorgang ist sehr komplex und schließt die in der Virusmembran enthaltenen verschiedenen Glykoproteinkomplexe (Ryckman et al. 2008), die Interaktion mit dem zellulären „epithelial growth factor receptor“ (EGFR) (Wang X. et al. 2003) und die Interaktion mit weiteren zellulären Integrinen mit ein (Feire et al. 2004, Wang X. et al. 2005). Nach dem Eindringen in die Wirtszelle wird das Viruskapsid über Mikrotubuli zum Kern transportiert (Ogawa-Goto et al. 2003) und die DNA in den Nukleus geschleust (Abbildung 2A). Dort angekommen wird die DNA an bestimmte Strukturen innerhalb des Kerns deponiert. Hierbei handelt es sich um die sogenannten „promyelocytic leukemia protein-associated nuclear bodies“ (PML bodies) oder auch einfach nur „Nuclear Domain 10“ (ND10) (Abbildung 2B), die vielfältige regulatorische Aufgaben innerhalb des Zellkerns wahrnehmen (Bernardi und Pandolfi 2007). Nach Anlagerung der DNA an diese Strukturen beginnt die Genexpression (Ishov und Maul 1996, Ishov et al. 1997, Maul 1998). Diese erfolgt in Zytomegalieviren nach einer

festgelegten Reihenfolge. Dementsprechend sind die Gene in verschiedene Genexpressionklassen eingeteilt, je nach Expressionzeitpunkt und in Abhängigkeit von früheren Genprodukten, die als Aktivatoren wirken können. Sofort nach Beginn der Infektion werden die „immediate-early“ (IE) Gene exprimiert, gefolgt von den „early“ (E) Genen und letztlich nach Einsetzen der Genomreplikation werden die „late“ (L) Gene exprimiert (Mocarski et al. 2007). Diese Genregulation ermöglicht, dass immer nur die Proteine gebildet werden, die in der jeweiligen Infektionsphase tatsächlich auch benötigt werden.



**Abbildung 2: Replikationsablauf der Zytomegalieviren.** (A) Schematische Darstellung des viralen Replikationszyklus (veränderte Darstellung nach <http://media.wiley.com/Lux/68/8368.nfg023.jpg>). (B) Immunfluoreszenzaufnahmen zweier Nuklei in uninfizierten Zellen nach Detektion des ND10 Matrixproteins PML und Anfärbung mit einem Alexa594/rot-gekoppelten Antikörper. Die Kerne wurden mit DAPI gefärbt und die Bilder wurden mit einem konfokalen Laserscanningmikroskop aufgenommen.

Innerhalb der ND10 Strukturen sind viele verschiedene Proteine lokalisiert (Hofmann und Will 2003), wobei einige mit einer Transkriptionsrepression in Verbindung gebracht wurden. Hierzu gehören das Protein Daxx und Sp100, aber auch das Matrixprotein PML selbst. Eine Verringerung der Expressionsstärke dieser Proteine („knock down“) mit verschiedenen molekularbiologischen Techniken konnte mit einer verbesserten viralen Transkriptionsfähigkeit in Verbindung gebracht werden (Tavalai et al. 2008, Woodhall et al. 2006). Tatsächlich zerstört das sehr früh exprimierte Protein IE1, sowohl bei MCMV als auch bei HCMV, die ND10 Strukturen und stellt somit eine effiziente Transkription sicher (Ahn und Hayward 2000, Tang und Maul 2003). Das ebenfalls sehr früh synthetisierte HCVM Protein IE2 und das homologe MCMV Protein IE3 sind nötig, um die Expression der E Gene zu starten. Deletionsmutanten sind nicht in der Lage, diese zu exprimieren und können daher auch keine permissive Infektion etablieren (Angulo et al. 2000, Marchini et al. 2001). Zur Klasse der E Gene gehören u.a. die Genprodukte der Region M112/113 in MCMV bzw.

UL112/113 in HCMV, deren Genorganisation und Expressionsmuster sehr ähnlich sind (Ciocco-Schmitt et al. 2002, Wright und Spector 1989). Durch alternatives Spleißen entstehen ausgehend von dieser Genregion mindestens 4 verschiedene Proteinisoformen, die in MCMV 33, 36, 38 und 87 kDa groß sind (Ciocco-Schmitt et al. 2002) und in HCMV 34, 43, 50 und 84 kDa (Wright und Spector 1989). Neuere Arbeiten legen nahe, dass es noch weitere Proteinisoformen gibt, die durch posttranslationale Proteolyse entstehen können (Wang S. K. et al. 2009). Die verschiedenen Isoformen bilden in der Nähe der ND10 Strukturen, zusammen mit dem IE2 bzw. IE3 Protein, die so genannten Replikationskompartimente aus, in denen später die virale Genomreplikation stattfindet (Ahn et al. 1999). Hierzu rekrutieren die M112/113 Proteine durch ihre DNA-Bindeaktivität virale DNA und weitere wichtige DNA-Replikationsfaktoren (Iwayama et al. 1994, Park et al. 2006). Zusätzlich bewirken sie zusammen mit den IE Proteinen eine effiziente Expression weiterer E Gene, die für die DNA-Replikation eine wichtige Rolle spielen (Iskenderian et al. 1996, Kerry et al. 1996). Der Zusammenbau dieser Replikationskompartimente ist ein sehr komplexer Prozess und hier sehr vereinfacht dargestellt. Tatsächlich sind die genauen molekularen Interaktionen und Abläufe bisher nur unzureichend aufgeklärt und bedürfen weitere Untersuchungen. Nach dem Zusammenbau der Replikationskompartimente erfolgt die eigentliche DNA-Replikation ausgehend vom lytischen Replikationsursprung („origin of lytic replication“ oder „ori<sub>Lyt</sub>“) nach dem „rolling circle“ Modell (Anders et al. 1992), da die Virion-DNA im Nukleus ringförmig vorliegt. Der Zusammenbau der replizierten DNA und der Kapsidproteine zum Nukleokapsid erfolgt im Kern. Dieses wird über die innere und äußere Kernmembran ins Cytoplasma geschleust (Camozzi et al. 2008, Milbradt et al. 2009) (Abbildung 2A). Das Nukleokapsid wird mit Hilfe von Mikrotubuli durch das Cytoplasma transportiert, wobei es zur Anlagerung der Tegumentproteine kommt (Sanchez et al. 2000). Die eigentliche Hüllmembran erhalten die Nukleokapside dann durch Einstülpung und Abknospung („budding“) an einem vom Golgiapparat abstammenden sekretorischen Vesikel (Homman-Loudiyi et al. 2003, Silva et al. 2003). Dieses enthält in seiner Membran die synthetisierten viralen Glykoproteine und wird zur Zellmembran transportiert (Abbildung 2A). Dort verschmilzt es dann mit der Zellmembran wodurch die umhüllten fertigen Virusnachkommen letztlich freigesetzt werden (Mettenleiter et al. 2006).

## 1.5 Virus-Wirt-Interaktionen

Mit dem Andocken des Viruspartikels und dem Eindringen in die Wirtszelle werden verschiedene Signalwege aktiv bzw. passiv induziert und zusätzlich werden eine Vielzahl von Tegumentproteinen in die Zelle eingeschleust (Kalejta 2008). Die Signalwege werden zum

einen durch das Virus selbst aktiviert, um die Zelle somit auf die Virusreplikation vorzubereiten. Zum anderen werden diese aber auch von der infizierten Zelle selbst aktiviert, um hierdurch eine Virusreplikation zu verhindern und so den Organismus zu schützen. Diese zellulären Abwehrmechanismen muss das Virus umgehen können, um eine produktive Infektion zu etablieren. So werden z.B. die Toll-like-Rezeptoren (TLR) als Teil des angeborenen Immunsystems durch die Infektion aktiviert, was u.a. zu einer Induktion des Interferonweges als Abwehr der Virusinfektion führt (Compton T. et al. 2003, Tabeta et al. 2004). Andererseits aktiviert CMV die Transkription der zellulären Onkogene c-jun, c-fos und c-myc, die für eine effektive Genregulation/Transkription benötigt werden, was einen Vorteil für das Virus bedeutet (Boldogh et al. 1991). Desweiteren werden viele weitere Signalwege aktiviert und zelluläre Abwehrmechanismen modifiziert, die u.a. die Aktivität der G-Protein gekoppelten Rezeptoren und damit die intrazelluläre Konzentration der sekundären Botenstoffe wie  $Ca^{2+}$  beeinflussen (Evers et al. 2004, Fortunato et al. 2000, Yurochko 2008). Im Folgenden sollen einige wichtige Virus-Wirt-Interaktionen kurz erläutert werden.

Die Erkennung der Virusinfektion erfolgt unter anderem durch die Proteinkinase R (PKR). Diese liegt im Cytoplasma inaktiv vor, wird durch Bindung an doppelsträngige RNA aktiviert und letztlich führt dies über die Phosphorylierung des Translationsfaktors eIF2 $\alpha$  zu einem Stopp der gesamten Proteintranslation in der Zelle, wodurch die Virusreplikation verhindert werden soll (Williams 1999). Bei der Replikation von CMV entstehen aufgrund gegenläufiger RNA-Transkripte doppelsträngige RNA-Intermediate, die von der PKR erkannt werden können. Um dies zu verhindern, kodiert MCMV z.B. die Proteine m142/143, die zusammen die Aktivierung der PKR und den damit ausgelösten Translationsstopp verhindern können, wodurch eine effiziente virale Proteinbiosynthese gewährleistet wird (Child et al. 2006, Valchanova et al. 2006).

Eine weitere sehr wichtige Virus-Wirt-Interaktion ist die Fähigkeit der Zytomegalieviren Apoptose zu inhibieren. Unter Apoptose versteht man den „programmierten Zelltod“ nach einem feststehenden Ablauf, der initiiert wird z.B. nach Infektion einer Zelle, um so den Gesamtorganismus zu schützen oder aber auch bei bestimmten Entwicklungsvorgängen eines Organismus (Jin und El-Deiry 2005). Die Regulation dieses Vorganges ist sehr komplex und kann hier nur vereinfacht dargestellt werden. Wichtige Elemente in diesem Signalweg stellen die Cystein-Aspartat-spezifischen Proteasen (Caspasen) dar, die je nach Aktivität in Effektor- oder Initiatorcaspasen unterteilt werden (Nunez et al. 1998). Prinzipiell unterscheidet man bei der Apoptose zwischen einem extrinsischen und intrinsischen Weg der Induktion. Der

extrinsische Weg läuft über die so genannten Todesrezeptoren (z.B. TNF-, Fas-Rezeptor) ab, die durch Bindung eines Liganden aktiviert werden. Diese Aktivierung führt über verschiedene Zwischenschritte zur Aktivierung der Caspase-8, die letztlich wiederum zur Aktivierung der Caspase-3 führt (Elmore 2007). Beim intrinsischen Weg, der durch Stresssignale innerhalb der Zelle ausgelöst wird, spielen die Mitochondrien eine wichtige Rolle (Elmore 2007). Nach Induktion dieses Weges werden die proapoptotischen Proteine Bax (im Cytosol) und Bak (an der Mitochondrienmembran) aktiviert, die sich dann an der Mitochondrienmembran ansammeln und oligomerisieren. Diese Oligomerisierung führt zur Porenbildung in der Mitochondrienmembran, wodurch Cytochrom-c freigesetzt wird. Dieses führt wiederum zur Aktivierung der Procaspase-9, die danach ebenfalls die Caspase-3 aktiviert. Diese Effektorcaspase-3 führt über verschiedene Wege letztlich zur Degradation antiapoptotischer Proteine, zellulären Proteinen und zur Degradation der DNA (Bossy-Wetzel und Green 1999, Elmore 2007, Kaufmann et al. 2000). Da Zytomegalieviren einen relativ langen Replikationszyklus durchlaufen, haben sie Strategien entwickelt, um der Induktion der Apoptose entgegenzuwirken. Die Aktivierung der Caspase-8 wird durch die Proteine UL36 (HCMV) bzw. M36 (MCMV), die so genannten „viral inhibitors of caspase-8-induced apoptosis“ (vICA), verhindert (Goldmacher 2005, McCormick et al. 2003). Der Aktivierung der proapoptotischen Proteine Bax und Bak steht die antiapoptotische Wirkung der MCMV Proteine m38.5 und m41.1 bzw. des HCMV Proteins UL37x1 gegenüber. Für m38.5 und UL37x1 wurde gezeigt, dass diese spezifisch mit Bax interagieren und somit die Bax-vermittelte Apoptose blockieren können (Arnoult et al. 2004, Jurak et al. 2008). Deshalb fasst man diese Proteine unter dem Begriff „viral mitochondria-localized inhibitors of apoptosis“ (vMIA) zusammen. Im Falle des MCMV Proteins m41.1 handelt es sich um einen neu identifizierten Inhibitor, der spezifisch die Oligomerisierung des Bak Proteins verhindert. Dieses wird deswegen als „viral inhibitor of Bak oligomerization“ (vIBO) beschrieben (Çam et al. 2009). Ein Protein mit homologer Funktion konnte in HCMV bisher nicht identifiziert werden.

Ein weiteres wichtiges Protein zur Inhibition der zellulären Signalwege stellt das MCMV Protein M45 dar. Dieses inhibiert die Signalweiterleitung von RIP-1 („Receptor-Interacting-Protein-1“), einem wichtigen Bestandteil des TNF-Rezeptors, und wird deshalb auch als „viral inhibitor of RIP-1 signalling“ (vIRS) bezeichnet. RIP-1 ist an der Aktivierung der Interferonantwort und an der Auslösung des Caspase-unabhängigen Zelltodes (programmierte Nekrose) beteiligt (Mack et al. 2008). Ein Protein mit homologer Funktion konnte in HCMV bisher nicht identifiziert werden.

Um eine effektive Transkription und Replikation der DNA zu gewährleisten, greifen Zytomegalieviren in den Zellzyklus ein. Sie bringen Zellen der G<sub>0</sub>-Phase wieder dazu, teilungsaktiv zu werden und halten Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase fest, in der eine optimale Transkription und virale DNA-Replikation abläuft und bedingen somit, dass keine S-Phase stattfinden kann. In dieser S-Phase würde ebenfalls die zelluläre DNA repliziert werden und dies wäre somit von Nachteil für die virale DNA-Replikation (Kalejta und Shenk 2002). Die Regulation des Zellzyklus über Zellzyklus-Regulatorproteine (Cykline) und deren Wechselwirkung mit viralen Proteinen ist noch relativ unverstanden. Für HCMV scheinen die Proteine IE2 und pp71 (UL82) hierbei jedoch eine zentrale Rolle zu spielen (Kalejta und Shenk 2003, Kalejta et al. 2003, Petrik et al. 2006). So konnte gezeigt werden, dass das Tegumentprotein pp71 das Retinoblastomprotein (Rb) degradiert, welches wichtig ist, um einen Übergang in die S-Phase zu gewährleisten (Kalejta et al. 2003). MCMV hingegen kann den Zellzyklus sowohl in der G<sub>1</sub>- als auch in der G<sub>2</sub>-Phase stoppen und dann replizieren. Die Fähigkeit zum Zellzyklusarrest wird durch die Aktivität des IE3 Proteins vermittelt, das Zellzyklus-unabhängig zusammen mit anderen IE Proteinen exprimiert wird (Wiebusch et al. 2008).

Tatsächlich gibt es kaum Daten darüber, ob all diese hier nur kurz geschilderten Virus-Wirt-Wechselwirkungen und die zusätzlichen hier nicht erwähnten Signalwege, die für eine produktive Infektion wichtig sind, auch in artfremden Zellen ablaufen können und funktionell sind. Abweichungen oder nicht funktionelle Interaktionen inhibitorischer oder aktivierender Art können somit nachteilig für die Virusreplikation sein und können deshalb auch als Barriere für eine speziesübergreifende Infektion angesehen werden, wie dies z.B. bei der Induktion der Apoptose der Fall ist (Jurak und Brune 2006).

## **1.6 Virale Spezies-Spezifität**

### **1.6.1 Virale Spezies-Spezifität im Allgemeinen**

Unter Spezies-Spezifität versteht man die Restriktion von Viren, nur in Zellen der eigenen Art oder einer nah verwandten Art replizieren und Virusnachkommen bilden zu können. Zum Aufbau einer produktiven Infektion muss eine effiziente initiale Infektion und eine effiziente Replikation innerhalb der Zelle gewährleistet sein. Im Falle einer Spezies-Spezifität können diese Bedingungen durch einen oder meist mehrere Faktoren negativ beeinflusst sein (Parrish et al. 2008). Um in eine Zelle eindringen zu können werden meist spezifische Rezeptoren benötigt, die allerdings in artfremden Zellen einen abweichenden Aufbau haben oder auch ganz fehlen können (Skehel und Wiley 2000, Stevens et al. 2006, Yamada et al. 2006). Ist das Eindringen der Viren nicht durch einen fehlenden Rezeptor beeinflusst, können intrazelluläre

Faktoren, wie z.B. die durch die Infektion ausgelöste Induktion der Interferonantwort, den weiteren Infektionsablauf negativ beeinflussen (Wang F. et al. 2004, Wobus et al. 2006). Auch können bestimmte Proteinkombinationen oder zelluläre Faktoren benötigt werden, die ein effektives Freisetzen der Virion-DNA, eine effiziente Genexpression und Genomreplikation oder das infizieren benachbarter Zellen begünstigen (McFadden 2005, Poulin und DeCaprio 2006).

Gelegentlich erwerben Viren durch fehlerhafte Replikationsvorgänge Mutationen oder durch Rekombination- und Rearrangementereignisse möglicherweise auch neue Gene, die eine Erweiterung des Wirtsspektrums mit sich bringen und letztlich zu schweren Infektionen des neuen Wirtes bis hin zu Pandemien mit neuartigen Erregern führen können (Weiss 2003). Dass es tatsächlich solche Szenarien gibt, haben uns verschiedene Beispiele in der jüngeren Vergangenheit bereits deutlichst gezeigt. So ging zum Beispiel die AIDS-Pandemie, die durch das humane Immundefizienzvirus (HIV) verursacht wird und die weltweit bisher mehrere Millionen Opfer verursachte, auf ein Virus zurück, das ursprünglich aus Affen stammt (Hahn et al. 2000, Heeney et al. 2006, Keele et al. 2006, Wain et al. 2007). Dieses erlangte im Laufe der Zeit die Fähigkeit, in humanen Zellen effizient zu replizieren (Malim und Emerman 2008, Sauter et al. 2009) und breitete sich über Jahre hinweg weltweit und mit verheerenden Folgen in der menschlichen Population aus.

Ein weiteres sehr prominentes Beispiel sind die Influenzaviren. Diese zeichnen sich durch den Besitz eines segmentierten Genomes aus. Aufgrund dieser Genomorganisation besteht deshalb bei einer Influenza-Doppelinfection ein erhöhtes Risiko, dass es zu einer Durchmischung der Erbinformationen und somit zur Entstehung neuer genetischer Reassortanten kommt. Des Weiteren besteht ihr Genom aus RNA, deren Replikation fehleranfällig ist. Deshalb können hierbei auch gehäuft Mutationen eingebaut werden, die einen Vorteil bei der Infektion oder Replikation in der fremden Spezies mit sich bringen können (Kuiken et al. 2006, Landolt und Olsen 2007). Am bekanntesten dürfte wohl die Spanische Grippe H1N1 von 1918 - 1919 sein, die weltweit circa 50 Millionen Todesopfer forderte (Johnson und Mueller 2002). Hierbei handelte es sich im Grunde um einen aviären Influenzastamm, der sich aber durch verschiedene Mutationen an den menschlichen Wirt angepasst hat (Taubenberger et al. 2005). Die beiden weiteren sehr großen Pandemien von 1957 (H2N2/Asiatische Grippe) und 1968 (H3N2/Hong Kong Grippe) gehen auf Influenzaviren des Types H1N1 („Spanische Grippe“) zurück, die aber durch Reassortierung neue aviäre Anteile aufgenommen haben und weltweit ebenfalls mehrere hunderttausend Todesopfer forderten (Kawaoka et al. 1989). Auch die „Vogelgrippe“ H5N1, die zwischen

2003 und 2006 verstärkt auftrat, stellt ein Vogelvirus dar, das zusätzliche Mutationen im Hämagglutinin-Protein (HA) enthält. Diese Mutation bietet dem Virus einen deutlichen Vorteil bei der Adsorption an die Lungenepitheloberfläche humaner Wirte und dient somit einer Erweiterung des Wirtsspektrums, wobei es trotz allem nur schwer von Mensch zu Mensch zu übertragen war (Skeik und Jabr 2008, Yamada et al. 2006). Anders sieht dies mit der „Neuen Grippe“ („Schweinegrippe“) des Types H1N1 aus. Diese Variante der Influenzaviren besteht aus aviären, humanen und porcinen genetischen Elementen, die durch mehrfache Reassortierung vermutlich im Schwein entstanden sind und die ein sehr hohes Mensch-zu-Mensch-Übertragungspotential besitzen (Scalera und Mossad 2009, Sinha et al. 2009, Smith G. J. et al. 2009). Es wird befürchtet, dass die Ausbreitung dieses Stammes zu einer starken weltweiten Pandemie mit sehr vielen Todesopfern führen kann.

Diese beiden Beispiele zeigen, wie wichtig es ist, die molekularen Ursachen der Speziespezifität zu untersuchen und zu verstehen und wie wichtig es ist, neu auftretende Infektionsketten rechtzeitig zu erkennen und zu intervenieren. Mit Ausbreitung der menschlichen Population, deren weltweiten Mobilität und dem engen Kontakt zu Tieren in neu erschlossenen Lebensräumen kann es immer wieder zu speziesspezifischen Infektionen kommen und neuartige virale oder auch bakterielle Erreger können sich so in der menschlichen Population etablieren und unbekannte Krankheiten auslösen (Mahy und Brown 2000, Parrish et al. 2008, Weiss 2003).

### **1.6.2 Spezies-Spezifität bei CMV**

Zytomegalieviren werden der Unterfamilie der  $\beta$ -Herpesviren zugeordnet (Modrow et al. 2003). Seit ihrer Isolierung und Kultivierung in Zellkultur werden sie als strikt speziespezifisch angesehen (Smith M. G. 1954, Weller 1970). Diese Spezies-Spezifität bedingt, dass Zytomegalieviren nur in Zellen der eigenen oder auch in sehr nah verwandten Arten replizieren können. Sie ist vermutlich durch eine lange Co-Evolution mit dem jeweiligen spezifischen Wirt entstanden, denn phylogenetische Analysen ergaben, dass die CMV-Artbildung zeitgleich mit der Wirts-Artbildung einherging (McGeoch et al. 1995).

Für HCMV konnte gezeigt werden, dass dieses in der Lage ist, in primären Schimpansenhaut-Fibroblasten permissiv zu replizieren (Perot et al. 1992). Das Schimpansen-CMV kann umgekehrt ebenso in den artfremden humanen Zellen eine permissive Infektionen etablieren (Lafemina und Hayward 1988). Ähnlich verhält es sich bei Nagetier CMVs. Ein Ratten-Zytomegalievirus (RCMV) kann zwar nicht in Mausfibroblasten replizieren (Bruggeman et al. 1982), dafür wurde aber gezeigt, dass MCMV in Rattenzellen repliziert (Bruggeman et al. 1982, Smith C. B. et al. 1986). In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass

Zytomegalieviren speziesspezifische Zellen infizieren können und auch in der Lage sind, in artfremden Zellen bestimmte IE und E Gene zu exprimieren. Dies legt den Schluss nahe, dass hierzu keine speziesspezifischen Faktoren benötigt werden (Ellsmore et al. 2003, Fioretti et al. 1973, Kim und Carp 1971, 1972, Lafemina und Hayward 1988, Plummer et al. 1969, Reed et al. 1975). Da außerdem verschiedene Zellarten unterschiedlicher Spezies infizierbar waren, konnte somit ausgeschlossen werden, dass es einen spezifischen Rezeptor gibt, der für eine effiziente Infektion benötigt wird. Vielmehr scheint eine Blockierung der späten Genexpression und/oder der Genreplikation der Speziesbarriere zu Grunde zu liegen (Mocarski et al. 2007). Die molekularen Grundlagen der Spezies-Spezifität bei Zytomegalieviren sind noch weitestgehend unbekannt. Eine neuere Arbeit zeigte, dass die Infektion humaner Zellen mit MCMV zu einer Induktion der apoptotischen Signalwege führt, wodurch im finalen Stadium die Zelle stirbt und eine effektive Virusreplikation nicht mehr gewährleistet werden kann (Jurak und Brune 2006). Wird die Induktion der Apoptose durch Überexpression eines antiapoptotischen Gens verhindert, kann eine permissive Infektion in den speziesspezifischen Zellen stattfinden und neue Viruspartikel werden gebildet und freigesetzt (Jurak und Brune 2006). Diese Studie zeigte, dass MCMV in humanen Zellen theoretisch replizieren kann, allerdings muss die Apoptose dazu unterdrückt sein und eine Replikation ist selbst dann nur auf Kosten einer geringeren Effizienz und einer verzögerten Kinetik möglich. Eine weitere Arbeit bezüglich MCMV Replikation in humanen Zellen legt den Schluss nahe, dass mit Hilfe des HCMV Proteins IE1 und mit Hilfe einiger HCMV Tegumentproteine MCMV in der Lage ist, Virusnachkommen in speziesspezifischen Zellen zu bilden (Tang und Maul 2006).

Beide Arbeiten zeigen somit, dass die Ursache der nicht-permissiven Infektionen in speziesspezifischen Zellen darin zu suchen ist, dass Zytomegalieviren nicht in der Lage sind, die zellulären Bedingungen in artfremden Zellen zu ihrem Vorteil zu modulieren. Dies kann auf alle Phasen des Infektionszyklus zutreffen z.B. die Genexpression, die DNA-Replikation oder aber in besonderem Maße bei der Abwehr der Virusinfektion durch das Immunsystem *in vivo*. Im Gesamtorganismus spielen solche wichtige Faktoren wie Immunevasion und Dissemination über Zellen des Immunsystems eine wichtige Rolle. Um diese Abläufe zu beeinflussen kodieren Zytomegalieviren wichtige immunmodulatorische Proteine, die dazu beitragen, die angeborene und adaptive Immunantwort zu umgehen bzw. auszutricksen (Kavanagh et al. 2001, Lemmermann et al. 2009). Dies ist nötig, da sie einen relativ langen Replikationszyklus haben und dementsprechend auch leicht vom Immunsystem angreifbar sind. Da die Immunantworten in verschiedenen Spezies leicht divergieren, ist es vorstellbar, dass die an

---

die jeweilige Spezies adaptierte Immunmodulation im falschen Wirt nicht funktioniert. Das Immunsystem wird somit nicht beeinflusst und kann aktiv gegen das Virus vorgehen. Dies führt letzten Endes zu einer nicht produktiven Infektion im speziesfremden Wirt und kann somit ebenfalls als Speziesinfektionsbarriere angesehen werden.

### **1.7 Zielsetzung dieser Arbeit**

Wie bereits erwähnt, unterliegt das murine Zytomegalievirus (MCMV) einer strikten Spezies-Spezifität. Diese liegt zum Teil darin begründet, dass die Infektion humaner Zellen zur Induktion der Apoptose führt, wodurch die Zellen letztlich sterben (Jurak und Brune 2006). Bei der Durchführung dieser experimentellen Ansätze konnte allerdings beobachtet werden, dass es ab und an zu einer massiven Ausbreitung von MCMV in infizierten humanen Zellen kam (I. Jurak, persönliche Mitteilung). Solche Viren breiteten sich schnell in der Zellkulturschale aus und bildeten cytopathische Effekte und große Plaques im humanen Zellrasen aus. Diese Beobachtung war unerwartet und überraschend und führte dazu, die Spezies-Spezifität der Zytomegalieviren zu hinterfragen.

Ziel dieser Arbeit war es, die möglichen molekularen Ursachen, die diesem Phänomen der spontanen Adaptation an humane Zellen zu Grunde liegen und eine Replikation von MCMV in den artfremden humanen Zellen ermöglichen, zu bestimmen. Durch diese Untersuchungen soll ein besseres Verständnis der CMV-Spezies-Spezifität erreicht werden. Um dies zu bewerkstelligen wurde ein spontan adaptiertes MCMV isoliert, aufgereinigt und phänotypisch in Bezug auf Replikationsverhalten, Genexpression und Apoptoseinduktion untersucht. Es zeigte sich schnell, dass es sich um eine genetische Veränderung handeln musste, weshalb das komplette Genom dieses adaptierten Virus sequenziert und analysiert wurde. Detektierte Sequenzunterschiede zum parentalen MCMV wurden mittels zielgerichteter BAC-Mutagenese in das Wildtypvirus eingebaut und der Einfluss der eingebauten Mutationen wurde mittels Infektionsanalysen untersucht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zelllinien und Zellkulturmedium

Zelllinie	Beschreibung	Hersteller	Referenz
10.1	Spontan immortalisierte murine embryonale Fibroblasten mit Defekt in p53		(Harvey und Levine 1991)
hTERT-RPE-1 <sup>a</sup>	Mit Hilfe der Telomerase immortalisierte humane retinale Pigmentepithel-Zellen	ATCC: CRL-4000	(Bodnar et al. 1998)
MRC-5	Primäre humane Lungenfibroblasten, nur begrenzt passagierbar	ATCC: CCL-171	(Jacobs et al. 1970)
Phoenix <sup>b</sup>	Amphotrophe Verpackungszelllinie zur Herstellung von Retroviren basierend auf 293T Zellen, stabile Expression der <i>gag/pol/env</i> Gene des Moloney-Maus-Leukämie-Virus.		(Kinsella und Nolan 1996)

<sup>a</sup> regelmäßige Selektion mit 10 µg/ml Hygromycin B

<sup>b</sup> regelmäßige Selektion mit 200 µg/ml Hygromycin B und 2 µg/ml Diphtheriatoxin

Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM) mit Glucose (PAA)

Dulbeccos PBS (D-PBS) ohne Calcium und Magnesium (PAA)

Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%) in PBS (PAA)

Fetales Kälber Serum (FKS) (PAN)

#### 2.1.2 Viren

Virus	Beschreibung	Referenz
Murines Zytomegalievirus, Stamm Smith (MCMV/wt)	Rekombinantes murines CMV kloniert als BAC Konstrukt mit Expression des grün fluoreszierenden Proteins (GFP), Selektion in Bakterien über Chloramphenicol-Resistenz	(Messerle et al. 1997) (Wagner et al. 1999) (Brune et al. 2001)
Humanes Zytomegalievirus, Stamm AD169 (HCMV)	Rekombinantes humanes CMV kloniert als BAC Konstrukt mit Expression von GFP, Selektion in Bakterien über Chloramphenicol-Resistenz	(Borst et al. 1999)
MCMV/bclX <sub>L</sub>	rekombinantes murines CMV mit GFP und Insertion des antiapoptotischen humanen Genes für bclX <sub>L</sub> in der Genregion m02 - 06 durch pReplacer-Technik	(Jurak und Brune 2006)

Virus	Beschreibung	Referenz
MCMV/UL37x1	rekombinantes murines CMV mit GFP und Insertion des antiapoptotischen HCMV Genes für UL37x1 in der Genregion m02 - 06 durch pReplacer-Technik	(Jurak und Brune 2006)
MCMV/hIE1	rekombinantes murines CMV mit GFP und Insertion von HCMV IE1 in der Genregion m02 - 06 durch pReplacer-Technik	(Jurak und Brune 2006)

### 2.1.3 Bakterien und Bakterienkulturmedium

<i>E. coli</i> Stamm	Beschreibung	Hersteller	Referenz
DH10B <sup>a</sup>	<i>F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 endA1 recA1 deoR Δ(ara,leu)7697 araD139 galU GalK nupG rpsL λ-</i>	Invitrogen (Carlsbad, USA)	(Grant et al. 1990)
Dy380 <sup>b</sup>	DH10B [ $\lambda$ c1857 ( <i>cro-bioA</i> ) $\langle\rangle$ Tet] <i>GalK<sup>+</sup> gal490</i> , temperatursensitive Expression des RecA Rekombinationssystems ( <i>exo</i> , <i>bet</i> und <i>gam</i> )		(Lee et al. 2001)
SW102 <sup>b</sup>	Basierend auf Dy380 <i>gal<sup>+</sup></i> , allerdings mit $\Delta$ <i>GalK</i> , temperatursensitive Expression des RecA Rekombinationssystems ( <i>exo</i> , <i>bet</i> und <i>gam</i> )		(Warming et al. 2005)

<sup>a</sup> Selektion mit Tetracyclin möglich, Zucht der Bakterien bei 37°C

<sup>b</sup> Selektion mit Tetracyclin möglich, Zucht der Bakterien bei 30°C, Induktion des Rekombinationssystems durch Hitzeschock (15 min, 42°C mit Schütteln)

#### Luria-Bertani Flüssigmedium (LB)

1 % Bactotrypton (Roth), 0,5 % Hefeextrakt (Roth), 0,5 % NaCl

#### Luria-Bertani-Agarplatten

1 % Bactotrypton (Roth), 0,5 % Hefeextrakt (Roth), 0,5 % NaCl, 15 g/l Agar-Agar

#### M9 Medium

6 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/l NH<sub>4</sub>Cl, 0,5 g/l NaCl

#### 5x M63 Medium

10 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 68 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,5 mg/l FeSO<sub>4</sub>×7 H<sub>2</sub>O pH 7 mit KOH

#### M63 Minimalplatten (Positivselektion)

M63 Medium, 1 mM MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O, 15 g/l Agar-Agar, 0,2 % D-Galactose, 1 mg/ml D-Biotin (steril filtriert), 45 mg/L L-Leucin (Steril filtriert), 15 µg/ml Chloramphenicol

#### MacConkey Agar

MacConkey Agar (Difco), 1 % D-Galactose, 12,5 µg/ml Chloramphenicol

**M63/DOG Minimalplatten (Negativselektion)**

M63 Medium, 1 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 15 g/l Agar-Agar, 0,2 % Glycerol, 1 mg/ml D-Biotin, 45 mg/L L-Leucin, 0,2 % Deoxy-Galactose, 15 µg/ml Chloramphenicol

**2.1.4 Antibiotika**

Antibiotika	Arbeitskonzentration	Selektionsorganismus
Ampicillin (Roth)	100 µg/ml	<i>E. coli</i> Stämme
Chloramphenicol (Roth)	15 µg/ml	<i>E. coli</i> Stämme
Kanamycin (Roth)	50 µg/ml	<i>E. coli</i> Stämme
Tetracyclin (Applichem)	5 µg/ml	<i>E. coli</i> Stämme
Zeocin (Invitrogen)	25 µg/ml	<i>E. coli</i> Stämme
Diphtheriatoxin (Sigma)	2 µg/ml	Phoenix Zellen
Hygromycin B (PAA)	10 bzw. 200 µg/ml	RPE-1 bzw. Phoenix Zellen
Puromycin (Sigma)	5 µg/ml	Selektion transduzierter RPE-1
Penicillin (PAA)	100 U/ml	Zellkulturmediumsupplement
Streptomycin (PAA)	100 µg/ml	Zellkulturmediumsupplement

**2.1.5 Plasmide**

Plasmidname	Beschreibung <sup>a</sup>	Quelle/Referenz
pSLFRT-kan	4,3 kb, „high copy“ Plasmid zur Amplifikation des Kanamycingens und flankierenden FRT-Sequenzen (FTR-Kan-Kassette), <i>amp</i> <sup>R</sup> , <i>kan</i> <sup>R</sup>	(Atalay et al. 2002)
pZeo4	2,8 kb, „high copy“ Plasmid zur Amplifikation des Zeozin-Resistenzgens; <i>amp</i> <sup>R</sup> , <i>zeo</i> <sup>R</sup>	Wade Bresnahan, University of Texas Medical Branch, Galveston, USA
pHM2237	6,4 kb (pSIREN-RetroQ, Clontech) zur Expression von siRNA/shRNA über U6 Promoter nach Herstellung von Retroviren und stabiler Transduktion in eukaryontische Zellen, Leervektor, <i>amp</i> <sup>R</sup> , <i>puro</i> <sup>R</sup>	(Tavalai et al. 2006)
pHM2238	basiert auf pHM2237, Expression einer nicht funktionellen shRNA-Luciferase (halfside), Kontrollkonstrukt shRNA-C	(Tavalai et al. 2006)
pHM2240	basiert auf pHM2237, Expression von shRNA-Daxx1, führt nach stabiler Transduktion humaner Zellen zum „knock down“ des zellulären Daxx Proteins	(Tavalai et al. 2008)
pHM2243	basiert auf pHM2237, Expression von shRNA-PML2, führt nach stabiler Transduktion humaner Zellen zum „knock down“ der zellulären PML Proteinisofomen	(Tavalai et al. 2006)

Plasmidname	Beschreibung <sup>a</sup>	Quelle/Referenz
pGalK	4,2 kb, „high copy“ Plasmid zur Amplifikation des <i>GalK</i> -Gens, dient zur Positiv-/Negativ-Selektion während einer BAC-Mutagenese, <i>amp</i> <sup>R</sup>	(Warming et al. 2005)
pGalK-Kan	5,4 kb, „high copy“ Plasmid, codiert neben dem <i>GalK</i> -Gen für eine Kanamycin-Resistenz ( <i>kan</i> <sup>R</sup> ), Amplifikation von <i>GalK-kan</i> zur Positiv-/Negativ-Selektion während einer BAC-Mutagenese, <i>amp</i> <sup>R</sup> , <i>kan</i> <sup>R</sup>	D. Yu, Washington University School of Medicine, USA
pFlagCMV5a	4,7 kb, „high copy“ Expressions-vektor über CMV-Promoter, Möglichkeit der C-terminalen FLAG-Markierung gegeben, <i>amp</i> <sup>R</sup>	Sigma
pBlueScript II KS <sup>+</sup>	3,0 kb, „high copy“ Plasmid mit pUC ori, Blau/Weiss-Selektion über <i>lacZ</i> -Gen möglich, Sequenzierung des klonierten Gens über M13_fw/rev-Primer möglich, <i>amp</i> <sup>R</sup>	Stratagene
pCR <sup>®</sup> 2.1-Topo/IE1	4 kb, beinhaltet Genfragment von murinem IE1, dient als Standard in der RealTime-PCR	M. Budt, FG12, RKI, Berlin
pCR <sup>®</sup> 2.1-Topo/c-myc	4 kb, beinhaltet Genfragment von <i>c-myc</i> , dient als Standard in der RealTime-PCR	M. Schulze, ZBS1, RKI, Berlin
pCP20	9,4 kb, „low copy“ Plasmid, nach Hitzeinduktion erfolgt Expression der Flp-Rekombinase in prokaryotischen Zellen; <i>amp</i> <sup>R</sup>	(Datsenko und Wanner 2000)
pRetro-GFP	12,3 kb, „low copy“ Plasmid, retroviraler Vektor mit GFP-Expression zur Herstellung von Retroviren, Transduktionseffizienz sichtbar durch GFP-Expression in der Zielzelle, nur transiente Expression möglich, <i>amp</i> <sup>R</sup>	T. Shenk, Princeton University, USA
pcDNA_M45	„high copy“, Vektor basierend auf pcDNA3 zur Expression des MCMV M45 Gens, <i>amp</i> <sup>R</sup> , <i>neo</i> <sup>R</sup>	(Mack et al. 2008)
pcDNA3	5,4 kb, „high copy“ Plasmid, Expressionsplasmid für Säugerzellen über CMV-Promoter, <i>amp</i> <sup>R</sup> , <i>neo</i> <sup>R</sup>	Invitrogen
pp89UC	7,3 kb, „high copy“ Plasmid basierend auf pUC19 mit eukryotischem Promoter zur Expression von MCMV IE1 nach Transfektion in Säugerzellen	Messerle M., Medizinische Hochschule Hannover, Deutschland
pCGN-IE1	8,9 kb, „high copy“ Plasmid basierend auf pCGN, Expression von HCMV IE1 über CMV-Promoter nach Transfektion in Säugerzellen	Nevels M., Universität Regensburg, Deutschland
pEGFP-C1	4,7 kb, „high copy“ Plasmid, Expressionsvektor für GFP-Fusionsproteine über CMV Promoter, <i>neo</i> <sup>R</sup> , <i>kan</i> <sup>R</sup>	Clontech

<sup>a</sup> *amp*<sup>R</sup>, Ampicillinresistenz; *kan*<sup>R</sup>, Kanamycinresistenz; *zeo*<sup>R</sup>, Zeocinresistenz; *neo*<sup>R</sup>, Neomycinresistenz, *puro*<sup>R</sup>, Puromycinresistenz

### 2.1.6 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma „Invitrogen“ synthetisiert und als Primerstock (100 µmol) bei -20°C gelagert. Vor der Verwendung wurden die Primer jeweils auf 10 µmol verdünnt. Eingeführte Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen und im Primernamen genannt. Die Schmelzpunkte der Primer wurden mit Hilfe folgender Formel berechnet:  $69,3 + 0,41\% \times GC\% - 650/n$ , wobei n die Nukleotidanzahl des jeweiligen Primers darstellt.

**Tabelle 2: Verwendete Primer zur Synthese von PCR-Fragmenten zur Rekombination, Klonierung oder Sequenzierungsprimer.** Eingeführte Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen. Homologe Bereiche, die eine Rekombination ermöglichen sollen, sind mit kleinen Buchstaben angeben.

<b>Primernamen</b>	<b>Sequenz (5' → 3')</b>
<b><u>Klonierung M112/113</u></b>	
M112_Not_fw	GTTCTGCGGCCGCGGTAGATTACGTGCCCACTTTTC
M113_Pst_Mfe_revII	CAACTGcagtcagtttagagtttacagagcatcatttctttatccatctttcaA Ttgagatcaattaagatcatcgaaacaca
M13_fw	GTAAAACGACGGCCAG
M13_rev	CAGGAAACAGCTATGAC
pBM112/1_fw_NEU	AAGTCATCCTGGTCGAACAC
pBM112/2_fw	AGTTATGCTGCTAGTTCGCT
pBM112/1_rev	ACAGGTTTCTGCTGAGCGGC
M112/3_fw	CATCCTGGTCGAACACTCGC
M112/2_rev	GGACCTCATGCATGCTAGCC
M112/4_fw	TGCTGCTAGTTCGCTGTCCG
<b><u>Mutageneseprimer</u></b>	
<b><u>M112/113 (FRT)</u></b>	
M112_Zeo_fw	ACGTGCCCACTTTTCTCGTCGCGACCGGTGAAAAGACCTTCGTTCCGACC tgttgacaattaatcatcgcat
M113_Zeo_rev	AGTCAGTTAGAGTTTACAGAGCATCATTTCTTTATCCATCTTTCATGAGA tcagtcctgctcctcgcca
<b><u>M112/113 (GalK-Kan)</u></b>	
M112/gal_fw	ACGTGCCCACTTTTCTCGTCGCGACCGGTGAAAAGACCTTCGTTCCGACC cctgttgacaattaatcatc
M112/Kan_rev	ATGCAGCGTCCGACTCGAGTTCGGGAAGGTGAAGTAACGTCGCTCTCGAAA ctcagcaaaagtctcgattta
Rev/M112_fw	TGATAGTTTCTGCGTCGCGG
Rev/M112_rev	TGACGGAGGTGCAACATGCG
Seq/M112_fw	CGGAGACCGCAGGTTATAAC
Seq/M112_rev	TGTCCGGAGACTGCATGATG
Intron2/gal_fw	CTCCTTTTTGAACAGTTATGCTGCTAGTTCGCTGTCCGCCGTCAGCGATG cctgttgacaattaatcatc
Intron2/Kan_rev	AGTCTCATCAGGGAATTAAGACGCCTTCAAAACGCGGGTTGTTGTCCCTC ctcagcaaaagtctcgattta
RevIntron2/fw	GATGGTAATGCAGACGAAGC
RevIntron2/rev	AACTCGAGCTGGTGTCTTTG
SeqIntron2/fw	GTTCCGAAAGGTTCTCCACG
SeqIntron2/rev	GGCCGTATCTCACATACAGG
<b><u>M116 (GalK)</u></b>	
M116_GalK_fw	CGAGACGACGGTCCCGCGCCGGCTCCGCCCGCGGCACCAGCGCCAGCAG cctgttgacaattaatcatcgcca
M116_GalK_rev	GTTCGACGCTCTCGGGCCGGTTCTGTGTTCCGCGGGGCTGCTGGTGTCTGC tcagcactgtcctgctcctt
M116_rev_seq	ATCATCGCCGCCAGTGGCGT

<b>Primername</b>	<b>Sequenz (5' → 3')</b>
M116_fw_seq1:	ATCGGATCCAGGCACCTCTC
M116_fw_seq3	ACGCCGTGACGGCCGTATAC
M116_rev_seq1	TCTCTGGTCTGTGACCCGC
M116_fw_seq2	CACCGACGGGACGAAGATCT
<b><u>m108 (GalK-Kan)</u></b>	
m108/gal_fw	AGCGGACCTGAAAACGGGGAAGGTCCGTCAGCCCTCGGAGGATCGGAGGA cctggttgacaattaatcatc
m108/kan_rev	GGTCTTCCGCCTCGTTACGCACGTGTAAGTATACGGCGTACGGAGCTCCG ctcagcaaaaagtctcgattta
Rev/m108_fw	GCGTGTCCGATGCGATCAAG
Rev/m108_rev	ACCGCTCGTTACAGGCAAC
Seq/m108_fw	CGACCGCTCGCTTCGATTAC
Seq/m108_rev	GTTTTCCCGGTCCGATCGGC
<b><u>Deletion m10/m18</u></b>	
m10/gal_fw	TTAATTTGCCCACATTTTCTACGTACACCTGGAACCGCCACACCTGTCC cctggttgacaattaatcatc
m14/gal_fw	ATCGGTTTCGAGGAAGCCCGAGATCACCGTGTGTCGGCTCAGAATCCTA cctggttgacaattaatcatc
m18/kan_rev	CTAGCACGCCATTCGGCAGCTTCGTCCCGACACCGCCGCTCCCACAGATA ctcagcaaaaagtctcgattta
m15/kan_rev	ATTTGAATCTGAATTTATCGATATATGTCCAGAATGTAAAAAACGAATT ctcagcaaaaagtctcgattta
<b><u>Einbau Punktmutation</u></b>	
M112/GAP_fw	CAGATCGACGCGGAGCGCCCATCGTTTCGA
M112/GAP_rev	TCGAAACGATGGGCGCTCCGCGTCGATCTG
MB CMV-seq	AACAACCTCCGCCCCATTGAC
SeqM112/GAP_rev	AGACTGCATGATGGTCGCG
Rev/GAP_fw	ACGTGCCCACTTTTCTCGTCG
Rev/M112_rev	TGACGGAGGTCTGAACATGCG
<b><u>Real Time PCR</u></b>	
myc-6015F	GCCAGAGGAGGAACGAGCT
myc-6095R	GGGCCTTTTTCATTGTTTTCCA
Ie1/4_fw	TGACTTAAACTCCCCAGGCAA
Ie1/4_rev	TAGGTGAGGCCATAGTGGCAG
<b><u>Resequenzierungen</u></b>	
M86_fw.1	TGATGATGTCGTCCGTCGTG
M86_rev.1	CATCAACACGGTGTTCCACG
MuHVgpM112_f	CAAGCCGGAGCGGATCCTAG
p262/12_f	CTCGCTCTATAGCAGTAGAA
p262/11_r	CGGTGCGAGCTCTAGACACGC
p263/16_r	GTCAACTTTCCCTGTGAGCG
p265/10_f	GCGTCTCGAGCTTCTGTGTC
p265/9_r	GACGTCGTTTTGCACGACTGC
p267/2_f	CAAAGAACCTCCCCGAGATCC
p267/1_r	CCCATTCCGCGTTCTGATG
p271/8_f	GTCGAGTGGTGGAAGGACGT
p271/7_r	GATCGTGAGCACGCACACCG
p272/4_f	CGAAATCGGAGTCCTCCGCC
p273/13_r	CCTTTCATCGGTCTGGCGCA
p275/9_f	CTCGCTCGACTTCTGTAGCG
p275/8_r	GAGACGCGTTTTCCAGCGCGAA
p276/11_f	CGTACGCCGTATACTTACAC
p277/0_f	GTGCTGCTAGTAGGCTTGGC
p278/13_f	CTGGTGAGCCATCATTCCCA
p278/12_r	TGGCAGATCCTCTCGGATCG

Primername	Sequenz (5' → 3')
p279/16_f	GCACCGTTATCGATGGCCAT
p279/15_r	CCAGATCATCGGATACCTCG
p280/1_f	TAACCGTACGCGAAACACGC
p280/0_r	CCGTCTTCGATTCTCGGGC
p281/3_f	GGAGAGCTTGGAGAGGGGCC
p281/2_r	CACTTCGCTCTCGTGCCGAC
p282/7_f	TTCGCCCCGAGGTCGTGGAA
p282/6_r	CGCGCAGATCGTGAACATCA
p283/5_f	TTGGCTCCCCAGACCAGCGC
p283/5_r	GGGAAGCCGGACAGGGACCG
p283/4_r	CCGTCTGTATCTCATCTTC
p283/6_f	GTCGCGACGACTGCTCTGAC
p284/15_f	GATGTCCGGATCAGAAGCAT
p284/14_r	TACCCTGGGGTCTAAGGCAC
p280/1_fw.1	GCGTGACACCACCGCCTTCT
p267/1_rev.1	CTGCCGCCTTCGCGTATCTG
p284/14_rev.1	GAGCGATCGAAAACCGCGGT
p273/14_fw.1	CGTTAACGAGCGGGTGAACG
p281/3_fw.1	ATGAGGCTGGAGATGAGGCC
p272/3_rev.1	TCGAACGCTACTGTGCGCAGG
p282/7_fw.1	TGCGCGAACGCCTCCAGACA
p271/7_rev.1	TGGTGCAGGCGCTGAGAA
p265/10_fw.1	TGTCGTTTTCGTCGAGTCGCC
p276/10_rev.1	TCTGTCGCTCAGCGAGTTGG
p277/0_fw.1	CAACGCACGGCCAGATGGGT
p277/0_fw.2	CGATCACCGTGTGCGGTAGCG
p277/0_fw.3	GGACTAGTTCCGTTTGGGTC
p277/0_fw.4	GTTACCGTGATAGTGCTGGG
p280/0_rev.1	TGGATCAGGGTCTCTAGCAC
p280/0_rev.2	CACCACGCTCATCGCCAGCA
p280/0_rev.3	CCCAGGTGCAGCAGCAACAG
p280/0_rev.4	CGAGGTCTCGCTCGTCTACC
M32_fw.1	TTGTGCTCAGATCCGAGTCG
M93_fw.1	TTCGCCGTGATCTGGTACTC
m106_fw.1	AACACCTACGTACGTCGTCG
m117_fw.1	GACGGGAGAGAGCTCTTTCC
m117_rev.1	TGTCTCCGACGACAAAGTCG
m119_fw.1	TCGATCGTTCAGAGTCCTCG
M26_fw.1	CGCCCCCGATGTAAAAGATG
M37_fw.1	AGACGAGTTCGGATCCGTAC
M46_fw.1	CTGGGTCGTCGGTTTTTCGAC
M46_fw.2	ACATCGACGCGTCGGTGATG
M78_fw.1	GTGACGGGTGTAGCTACTAC
m58_fw.1	ATTATACAGGAGCGGGGTC
m59_fw.1	AATGACGTCACTCCCTGTGG
M71_fw.1	CGAGGAACAAAAGCAGCAGC
M35_fw.1	GCCGCCCAGAAACATTCTGA
M35_rev.1	GGAGGGCCTCTAGCATGTAC
M83_Seq	CTTCTTCGCGCGGTTAC
M83_fw	GCTACGCTTCAGGTTACCT
M83_rev	GTCAGGATGACGGTCCACAA
M55_Seq	GGGCTGGACATCGAGCC
m102_fw	TAAGGTGCCGCTCGTGCC
m102_rev	ATCCGCAGGACGGCGAAC
M116_fw	TCGTGCGCTTGTCCACGATC
M116_rev	CGAAGATCTTAATCTACGCC
M88_fw	AAGGACGAGGCCGTGCTAT
M88_fw	GAAGATGGACGTCTCGCAGT
M98_fw	GTCATGAAGGCGATCGAGA
M98_rev	ATCGGCGAAGCTCTGGAGAC

<b>Primernamen</b>	<b>Sequenz (5' → 3')</b>
M56_fw	CTCGGAGTCGACCGAGAGAT
M56_rev	CATCCTGCCGCACGTCAAAG
M122_fw	GAGGACCTTGATGAGTGGGA
M122_rev	AGGAGCCCCAGGTGATCT
M55_fw	CCTAGCCCCTGCATGAAAGT
M55_rev	GGAACACATCCAACCTCGTCG
m29_fw	GCTCGATTTTCTGATCGGG
m29.1_rev	TATCGAGAGGATGAACCTCC
m01_fw	GCGTGTGAAGCTTCCGCGAC
m01_rev	TGCGGATGAAGAGAATCGGG
m129_fw	GTGAGGAGGGGTGCTTATCC
m129_rev	CCTGCTTATCTTTGGTGC GC
m106_fw	ACCTACGTACGTGTCGTAC
m106_rev	AGAACACGTTGACATCGCCG
<b><u>Sequenzierung</u></b>	
<b><u>alternatives MCMV/h</u></b>	
Seq_m12/fw.1	GTTTGTACGCACACAGGAC
Seq_m15/rev.1	GTTGCGTACCATATGGCA
Seq_m14/fw.1	TATTGTCATCGCGTCTCTC
<b><u>Slot Blot Sonde</u></b>	
GC008	CAACAGCAACCTCAAGCCAAG
Sp6_rev	ATTTAGGTGACACTATAG

### 2.1.7 Größenstandards

Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas)  
Precision Plus Protein Kaleidoscope™ Standart (Bio-Rad)

### 2.1.8 Enzyme

Restriktionsenzyme (10 U/μl) (Fermentas)  
T4 DNA Ligase (5 U/μl) (Fermentas)  
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/μl)(Finnzymes)  
Platinum® *Taq* DNA Polymerase recombinant (5 U/μl) (Invitrogen)  
*Pfu* DNA Polymerase recombinant (5 U/μl) (Fermentas)  
Proteinase K (20 mg/ml) (Fermentas)  
Ribonuclease A (10 mg/ml) (Fermentas)  
λ-DNA (0,3 μg/μl) (Fermentas)

### 2.1.9 Kits

NukleoBond® PC100/PC 500 (Machery-Nagel)  
NukleoBond® Xtra Midi (Machery-Nagel)  
NukleoSpin® Extract II (Machery-Nagel)  
BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)  
Quikchange II site directed mutagenesis kit (Stratagene)  
*In situ* Cell Death Detection Kit (TMR red/TUNEL) (Roche)  
Dig High Prime Labelling and Detection Starter Kit II (Roche)  
ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham Biosciences)  
Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)  
BCA™ Protein Assay Kit (ThermoFisher)  
Protease Inhibitor Cocktail “Complete Mini” (Roche)  
Deoxyribonukleotid-Mix, je 10 mM dGTP, dCTP, dATP, dTTP (Invitrogen)

DNeasy<sup>®</sup> Blood and Tissue Kit (Qiagen)

### 2.1.10 Primärantikörper

Klonname	Hergestellt in	Antigen	Spezies <sup>a</sup>	Anwendung <sup>b</sup>	Quelle/Referenz
Chroma 101	Maus	IE1	MCMV	WB/IF 1:1000	Stipan Jonjic, Universität Rijeka, Kroatien
Chroma 103	Maus	E1	MCMV	WB/IF 1:1000	Stipan Jonjic, Universität Rijeka, Kroatien
3B9.22A	Maus	M44	MCMV	WB/IF 1:1000	Lambert Loh, Universität Saskatchewan, Kanada
	Kanichen	IE3	MCMV	WB/IF 1:150	Eva Borst, Medizinische Hochschule Hannover, Deutschland
2E8.21A	Maus	gB	MCMV	WB 1:1000	Lambert Loh, Universität Saskatchewan, Kanada
AC-74	Maus	β-Aktin	Säugerzellen	WB 1:20000	Sigma Aldrich
H-238	Kaninchen	PML	H/M/R	WB 1:150 IF 1:60	Santa Cruz Biotechnology <sup>®</sup>
E-94	Kaninchen	hDaxx	H	WB 1:1500	Epitomics
1B12	Maus	IE1	HCMV	IF 1:50	Thomas Shenk, Princeton University, NJ

<sup>a</sup> MCMV/ murines Zytomegalievirus, HCMV/ humanes Zytomegalievirus, H/human, M/Maus, R/Kaninchen

<sup>b</sup> WB/Western Blot, IF/Immunfluoreszenz

### 2.1.11 Sekundärantikörper

Klonname	Hergestellt in	Antigen <sup>a</sup>	Konjugation <sup>b</sup>	Anwendung <sup>c</sup>	Hersteller
P-0447	Ziege	IgG aus Maus	HRP	WB 1:1000	DAKO Cytomation
P-0399	Schwein	IgG aus Kaninchen	HRP	WB 1:1000	DAKO Cytomation
A-11029	Ziege	IgG aus Maus	Alexa Fluor <sup>®</sup> A-488 /grün	IF 1:1000	Invitrogen
A-11037	Ziege	IgG aus Kaninchen	Alexa Fluor <sup>®</sup> A-594 /rot	IF 1:1000	Invitrogen

<sup>a</sup> IgG/ Immunglobulin G

<sup>b</sup> HRP/Meerrettichperoxidase

<sup>c</sup> WB/Western Blot, IF/Immunfluoreszenz

### 2.1.12 Chemikalien

Standardchemikalien (p.a. Qualität) wurden von Carl Roth, Sigma Aldrich oder AppliChem bezogen. Alle anderen von dem jeweils angegebenen Hersteller.

Agar-Agar	Kaliumphosphat
Agarose	L-Leucin
Ammoniumchlorid	Magnesiumsulfat
Ammoniumpersulfat	Magnesiumsulfat
Ammoniumsulfat	Maleinsäure
Aqua Poly/Mount (Polyscience Inc.)	Methanol
Borsäure	Milchpulver (Sucofin)
Bromphenolblau	Natriumazid
Calciumchlorid	Natriumchlorid
Chloroform	Natriumcitrat
DAPI	Natrium-Deoxycholat
D-Biotin	Natriumdodecylsulfat/SDS
Deoxy-D-Galactose	Natriumhydrogenphosphat
Dextrose	Natronlauge
D-Galactose	Orange G
Dimethylsulfoxid	Paraformaldehyd
EDTA	Polybrene
Eisensulfat	Ponceau S
Essigsäure	Rotiphorese Gel 30
Ethanol/reinst	Salzsäure HCl
Ethidiumbromid	TEMED
Gelatine	Thiazolylblau
Glycerol	Tris
Glycin	TritonX-100
HEPES	Tween-20
Isopropanol	$\beta$ -Mercaptoethanol
Kaliumacetat	Phenol/Choroform-Mix ROTI <sup>®</sup> -Phenol
Kaliumlauge	

### 2.1.13 Puffer und Lösungen

#### SDS-PAGE/Western Blot

TritonX-Lysepuffer	10 mM Tris/HCl pH 8, 140 mM NaCl, 0,025 % NaN <sub>3</sub> , 1 % TritonX-100
RIPA-Lysepuffer	20 mM Tris/HCl pH 7,5, 300 mM NaCl, 1 % Na-Deoxycholat, 1 % TritonX-100, 0,1 % SDS
2 x Auftragspuffer	125 mM Tris/HCl, 4 % SDS, 20% Glycerol, 10 % $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,05 % Bromphenolblau,
Gelherstellungspuffer	30 % Acrylamid/Bisacrylamid Rotiphorese Gel 30 1,5 M Tris/HCl pH 8,8 0,5 M Tris/HCl 6,8 20 % SDS 10 % APS
SDS-PAGE Laufpuffer	45 mM Tris/HCl 345 mM Glycin 10 % SDS
Transferpuffer(Nitrocellulose)	50 mM Tris, 40 mM Glycin, 0,04 % SDS, 20 % Methanol
Ponceau S Färbung	0,1 % Ponceau S, 5 % Essigsäure
Blockierungspuffer	5 % Milchpulver in PBS
Waschpuffer	0,1-0,05 % Tween-20 in PBS

**Isolierung von Plasmid- und BAC-DNA****(„Mini“)**

S1 Puffer	50 mM Tris/HCl pH 8, 10 mM EDTA
S2 Puffer	200 mM NaOH, 1 % SDS
S3 Puffer	2,8 M Kaliumacetat pH 5,1
TE Puffer	10 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM EDTA

**Isolierung genomischer DNA**

Proteinase K Puffer	10 mM Tris/HCl pH 7,8 5 mM EDTA 0,5 % SDS 20 g/ml RNase (optional) 3 M Na-Acetat
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA

**Gelelektrophorese**

Autragspuffer 6x Orange Loading Dye	0,2 % Orange G, 60 mM EDTA, 60 % Glycerin
50 x TAE	2 M Tris, 5,7 % Essigsäure, 50 mM EDTA
5 x TBE	445 mM Tris, 445 Borsäure, 20 mM EDTA (pH 8)

**Immunfluoreszenz**

Beschichtung der Glasplättchen	0,4 % Gelatine in PBS
Fixierlösung	4 % Paraformaldehyd in PBS
Stabilisierungslösung	50 mM Ammoniumchlorid
Permeabilisierungslösung	0,3 % TritonX-100 in PBS
Blockierungslösung	0,2 % Gelatine in PBS

**Calciumphosphattransfektion**

Präzipitationspuffer 2 x HBS	50 mM HEPES pH7 mit NaOH, 10 mM KCl, 12 mM Dextrose, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Komplexbildungszusatz	2 M CaCl

**Southern Slot Blot**

20 x SSC	3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat pH 7
Waschpuffer nach Hybridisierung	2 x SSC, 0,1 % SDS 0,5 x SSC, 0,1 % SDS
Waschpuffer zur Detektion	0,1 M Maleinsäure pH 7,5, 0,15 M NaCl, 0,03 % Tween-20
Maleinsäurepuffer	0,1 M Maleinsäure pH 7,5, 0,15 M NaCl
Detektionspuffer	0,1 M Tris/HCl pH 9,5, 0,1 M NaCl

**TUNEL Assay**

Fixierung	3 % Paraformaldehyd (PFA)
Permeabilisierungslösung	0,1 % TritonX-100 in 0,1 % Na-Citrat

**MTT-Assay**

MTT Vorratslösung	5 mg/ml Thiazolylblau (MTT) in PBS
Solubilisierungslösung	DMSO/Ethanol (1:1)

**2.1.14 Verbrauchsmaterialien**

Hybond ECL/Nitrocellulose (GE Healthcare)  
Röntgenfilme (X-Ray Retina)  
Whatman Papier 3mm (Roth)  
Glasplättchen 1,5 x 15 mm (Hartenstein)  
Objekträger 76 x 26 mm (Roth)  
Elektroporationsküvetten (Eurogentec)  
Zellkulturschaber (TPP)

Zellkulturwaren (Greiner, Nunc, Sarstedt, TPP)  
Reaktionsgefäße (VWR)  
NytranSuperCharge Nylon (Schleicher & Schuell)  
Pipettenspitzen (VWR, Neolab)  
Cyro-Röhrchen 2 ml (steril) (Roth)  
0,45 µm Filteraufsätze Minisart® (Sartorius)

### 2.1.15 Geräte

ABI 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems)  
Agagel Maxi (Biometra)  
Agagel Midi-Wide (Biometra)  
Axiovert 25 Mikroskop (Zeiss)  
Bakterienbrutschrank (Mettler)  
Bakterienschüttelinkubator GFL3033 (Hilab)  
Bakterienschüttler Certomat® R (B. Braun Biotech International)  
Finnpipette® Multistep (ThermoFisher)  
Geldokumentation GelDoc XR (Bio-Rad)  
Gene Pulser XCell (Bio-Rad)  
GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystem)  
Glaspipetten (5 ml, 10 ml, 20 ml) (Brandt)  
Handstückzähler (Roth)  
Heraeus Multifuge 1S-R (ThermoFisher)  
Hybridisierungsöfen OVS (Biometra)  
Hybridisierungsröhren (ThermoFisher)  
Inverted Microscope Axiovert 200M (Carl Zeiss)  
Konfokales Laserscanning Mikroskop Axioplan LSM510 (Zeiss)  
Kühltischzentrifuge Hereus Fresco 21 (ThermoFisher)  
Kühlzentrifuge Sorvall® RC 5C Plus (ThermoFisher)  
Magnetrührer MR2002 (Heidolph)  
Mini-Protean 3 Cell (Bio-Rad)  
Multiplate Absorbance Reader Spectrafluor Plus (Tecan)  
Nanodrop (Peqlab)  
Neubauer Zählkammer (Marienfeld)  
PerfectBlue Gelsystem Mini S (Peqlab)  
PerfectBlue Gelsystem Maxi S (Peqlab)  
ph-Meter inoLab pH720 (WTW)  
Photometer Ultrospec 10 (GE Healthcare)  
Pipettboy acu (IBS)  
Pipetten 0,2 – 1000 µl (Gilson)  
Röntgenfilmentwicklermaschine X-Omat (Kodak)  
Röntgenfilm-Kassette (Dr. Goos-Suprema)  
Schüttler für Blots Wt-17 (Biometra)  
SlotBlot Apparatur (Roth)  
Spannungsgenerator Power-Pac™ Universal (Bio-Rad)  
Thermomixer 5496 (Eppendorf)  
Tischzentrifuge Centrifuge 5415D (Eppendorf)  
Transblot® SD Semi-dry Transfer Cell (Bio-Rad)  
Transferpette®-8 (BrandTech Scientific)  
TurboBlotter/Downward DNA Transfer System (Schleicher & Schuell)  
Überkopfschüttler Rotator SB2 (Stuart)  
UV Crosslinker Stratalinker Model 2400 (Stratagene)  
Vortex Mixer 7-2020 (Neolab)  
Zellkultur Inkubator HeraCell 150  
Zellkulturwerkbank Clean Air DLF/Rec 4 KL 2A (ThermoFisher)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkulturmethoden und Virusanzucht

#### 2.2.1.1 Kultivierung von Zellen

Alle Zellen wurden in Zellkulturschalen oder -platten in Zellkulturmedium gezüchtet und in einem Zellkulturinkubator bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Erreichten die Zellen Konfluenz, wurde das alte Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen, mit Trypsin losgelöst und dem Umsetzungsverhältnis entsprechend in neue Schalen/Platten überführt. Sollte eine genau definierte Zellzahl ausgesät werden, wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer für eukaryotische Zellen bestimmt.

#### 2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Lagern von Zellen in Flüssigstickstoff wurden subkonfluente Zellen mit Trypsin abgelöst, in ein Zentrifugationsröhrchen überführt und in einer Zentrifuge (200 g, 10 min) pelletiert. Das Zellpellet wurde in einem Gemisch aus DMSO/FKS (1:10) resuspendiert, dem Umsetzungsverhältnis entsprechend auf Cryoröhrchen verteilt und bei -80°C tiefgefroren. Zur langfristigen Lagerung wurden die Zellen anschließend in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen der Zellen wurde ein Cryoröhrchen im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, die Zellen mit Kulturmedium versetzt und zentrifugiert (200 g, 10 min). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet erneut in frischem Medium resuspendiert und dies in einer passenden Zellkulturschale verteilt. Nach dem Anheften der Zellen, spätestens jedoch am nächsten Tag, wurde das Medium komplett gewechselt.

#### 2.2.1.3 Virusrekonstitution durch Transfektion von BAC-DNA mit Polyfect

Um aus BAC-Konstrukten Virus für Infektionszwecke zu generieren, war eine Transfektion in eukaryotische Zellen nötig. Hierzu wurden am Tag vor der Transfektion  $1,5 \times 10^5$  murine 10.1 Fibroblasten pro Kavität in einer 6-Loch-Platte ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion von möglichst frisch isolierter BAC-DNA mit Polyfect nach dem vom Hersteller angegebenen Protokoll. Die in dieser Arbeit genutzten BAC-Konstrukte führen nach erfolgreicher Transfektion zu einer im Fluoreszenzmikroskop sichtbaren GFP-Expression. Konnte diese in einigen Zellen beobachtet werden, wurden die Zellen trypsiniert und komplett in eine Ø10 cm Schale überführt. Eine erfolgreiche Rekonstitution viraler Mutanten mittels BAC-Transfektion dauerte in der Regel 10-14 Tage. Deshalb war es nötig, die Zellen in dieser Rekonstitutionsphase je nach Bedarf umzusetzen. Nachdem alle Zellen einen cytopathischen Effekt und eine GFP-Expression zeigten, wurde das virushaltige Kulturmedium entnommen,

die Zelltrümmer mittels Zentrifugation (10 min, 200 g) entfernt und in 1 ml Aliquots bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Dieser Transfektionsüberstand wurde zum Anlegen eines Virusstocks benutzt.

#### **2.2.1.4 Virusanzucht aus Virusüberstand**

Alle MCMV/wt-Abkömmlinge, mit Ausnahme von MCMV/h, wurden auf murinen 10.1 Fibroblasten gezüchtet. MCMV/h hingegen wurde auf humanen RPE-1 Zellen gezüchtet. Hierzu wurden pro Virusstock jeweils drei Ø15 cm Schalen mit subkonfluenter Zellzahl mit geringer MOI infiziert (vgl. Abschnitt 2.2.1.5) und am nächsten Tag, wenn die Zellen infiziert und konfluent waren, abgelöst, vereint, auf insgesamt zehn Ø15 cm Schalen verteilt und anschließend im Zellkulturschrank bis zum Erntezeitpunkt inkubiert. Nachdem alle Zellen infiziert waren, wurde das Kulturmedium der Schalen vereint und die Zelltrümmer mittels Zentrifugation entfernt (6000 g, 15 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Der so gewonnene Virusüberstand konnte jetzt aliquotiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert werden. Zur Herstellung eines gereinigten Virusstocks wurde der zelltrümmerfreie Virusüberstand erneut zentrifugiert (25000 g, 3 h,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Das überschüssige Medium wurde anschließend vorsichtig entnommen und das entstandene Viruspellet mit 1,5 ml frischem Zellkulturmedium versetzt und über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Am nächsten Tag wurden die losgelösten Partikel gründlich resuspendiert und der gereinigte Virusstocks konnte aliquotiert werden. Die Lagerung erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . Virusaliquots wurden entnommen, bei  $37^{\circ}\text{C}$  aufgetaut und sofort zur Infektion genutzt.

Zum Anlegen eines HCMV Virusstocks wurden drei Ø15 cm Schalen mit jeweils ca. 25 % konfluenten primären MRC-5 mit niedriger MOI infiziert. Nachdem die Zellen konfluent waren, wurde diese auf wiederum zehn Ø15 cm Schalen aufgeteilt und erneut inkubiert bis alle Zellen einen cytopathischen Effekt aufwiesen. Anschließend wurde das gleiche Verfahren angewendet, wie zur Herstellung eines MCMV Virusstocks.

#### **2.2.1.5 Virustitration zur Bestimmung der $\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ und Virusinfektion von Zellen**

Zur Quantifizierung der Viruspartikel in einem Virusstock oder einem Zellkulturüberstand wurde die „median tissue culture infection dose“ ( $\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ ) Endpunktbestimmungsmethode genutzt. Dieser Wert gibt an, wie viele Viruspartikel statistisch nötig sind um 50 % einer definierten Zellzahl zu infizieren (Kaerber 1931, Mahy und Kangro 1996). Zur Bestimmung der  $\text{TCID}_{50}/\text{ml}$  wurden am Tag zuvor  $2 \times 10^5$  Zellen pro 96 Lochplatte ausgelegt. Am nächsten Tag wurde der zu bestimmende Virusstock oder Zellkulturüberstand logarithmisch (in Zehnerpotenzen) verdünnt und von jeder Verdünnung wurden jeweils 50 µl genutzt um 12 Kavitäten einer Reihe zu infizieren. Um Ungenauigkeiten vorzubeugen wurden parallel drei Bestimmungen durchgeführt. Anschließend wurden die Platten im Zellkulturschrank

inkubiert. Zur Titrationen von Virusstocks wurden zusätzlich zwei weitere Platten genutzt, um die Infektionserhöhung nach Zentrifugation, das so genannte „centrifugal enhancement“ zu bestimmen (Osborn und Walker 1968). Hierzu wurden die Platten wie bereits beschrieben infiziert und anschließend zentrifugiert (1100 g, 30 min) bevor diese inkubiert wurden (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Die TCID<sub>50</sub>/ml konnte im Falle von MCMV nach 5 bis 6 Tagen abgelesen werden bzw. erst nach 10 bis 12 Tagen, wenn HCMV titriert wurde. Zur Auswertung am Fluoreszenzmikroskop wurde jede Kavität auf Virusausbreitung untersucht, sichtbar an der GFP-Expression und am induzierten cytopathischen Effekt. Der Virustiter bestimmt als TCID<sub>50</sub>/ml errechnet sich dabei anhand der Formel von Spearman (1908) und Kaerber (1931):

$$Titer = \frac{10^N}{\text{Infektionsvolumen [ml]}} TCID_{50}/ml$$

$$N = \text{höchste Verdünnung 100\% CPE} + \left[ \frac{\text{Anzahl der Kavitäten mit CPE}}{\text{Anzahl der Kavitäten pro Verdünnung}} \right] - \frac{1}{2}$$

Um eine Infektion zu quantifizieren wurde die so genannte „Vielfachheit der Infektion“ oder im englischen „multiplicity of infection“ (MOI) als Maß verwendet. Hierzu wurde die zu infizierende Zellzahl festgelegt und anhand der gewünschten MOI errechnete sich die Menge an Virus, die nötig war für eine Infektion. Sollten alle Zellen infiziert werden, z.B. für Western Blot Analysen, wurde eine MOI von 5 TCID<sub>50</sub>/Zelle verwendet. Für Wachstumskurven wurde typischerweise eine MOI zwischen 0,1 - 0,2 TCID<sub>50</sub>/Zelle genutzt. Die errechnete Virusmenge wurde in die benötigten Menge Zellkulturmedium pipettiert und auf die zu infizierenden Zellen gegeben. Falls nötig, wurden die Zellen wie oben beschrieben zentrifugiert.

### **2.2.1.6 Wachstumskinetiken**

Zur Bestimmung der viralen Replikationsfähigkeit verschiedener Mutanten in spezieseigenen oder -fremden Zellen und deren Replikationsgeschwindigkeit wurden Wachstumskurven mit unterschiedlicher MOI TCID<sub>50</sub>/Zelle angesetzt.

Für Wachstumskurven mit einer MOI TCID<sub>50</sub>/Zelle von 0,2 wurden je 1,5 x 10<sup>5</sup> Zellen pro Kavität in einer 6-Loch-Schale in Triplikaten ausgesät, gleichzeitig mit der entsprechenden Menge an virushaltigem Kulturmedium versetzt und gut verteilt. Für Wachstumskurven mit einer MOI von 5 TCID<sub>50</sub>/Zelle wurden am Tag zuvor 5 x 10<sup>5</sup> Zellen ebenfalls in Triplikaten ausgesät. Am nächsten Tag wurden die nun fast konfluenten Zellen mit der entsprechenden Menge an virushaltigem Kulturmedium versetzt und zentrifugiert (vgl. Abschnitt 2.2.1.5). 4 h nach Infektion wurde das virushaltige Medium ausgetauscht und die Zellen gründlich mit

PBS gewaschen. Die Virusanfangsdosis wurde rücktitriert um festzustellen, ob tatsächlich die benötigte Menge an Virus eingesetzt worden ist. Ab dem ersten Tag der Infektion wurde nun in regelmäßigen Abständen das komplette Medium durch frisches ersetzt und das entnommene Medium in Aliquots bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Virusmenge im Medium an dem jeweils entnommenen Tag wurde durch Bestimmung der  $\text{TCID}_{50}/\text{ml}$  in jedem Triplikat analysiert. Verfolgt wurde die Wachstumskurve ca. 7-16 Tage oder bis alle Zellen infiziert oder tot waren

### **2.2.1.7 Herstellung von Retroviren und Generierung von stabilen „knock-down“ Zelllinien**

Zur Herstellung von Retroviren wurden Phoenix-Zellen mit den entsprechenden plasmidcodierten Retroviren mit Hilfe der Calciumphosphat-Transfektion transfiziert. Bei dieser Transfektionsmethode entstehen Calciumphosphat/DNA-Komplexe die durch Endocytose in die Zelle transportiert werden (Bacchetti und Graham 1977). Phoenix-Zellen basieren auf 293T-Zellen, die mit den *gag-pol-env*-Genen des „Moloney Murine Leukemia Virus“ (MMuLV) stabil transduziert sind, und deswegen zur Herstellung amphotropher Retroviren genutzt werden können.

Am Tag vor der Transfektion wurden  $2 \times 10^6$  Phoenix-Zellen pro  $\text{Ø}10$  cm Schale ausgesät. Am nächsten Tag wurden 10 - 20  $\mu\text{g}$  der zu transfizierenden DNA mit 61  $\mu\text{l}$  2M  $\text{CaCl}_2$  versetzt und mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 500  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Anschließend wurden tropfenweiße und unter schütteln 500  $\mu\text{l}$  2 x HBS hinzu pipettiert. Zur Bildung der DNA-Komplexe wurde der Transfektionsansatz bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert und anschließend auf die Phoenix-Zellen überführt. Nach 24 h wurde das Zellkultur-Medium komplett ausgetauscht. 48 h nach Transfektion wurde der retrovirushaltige Überstand entnommen, mit Hilfe eines 0,45  $\mu\text{m}$  Filters filtriert und auf die humanen RPE-1-Zellen überführt.

Hierzu wurden am Tag vor der Transduktion  $1,5 \times 10^5$  Zellen pro Kavität einer 6-Loch-Platte ausgesät. Zur Transduktion wurden pro Ansatz 4 ml frischer Retrovirusüberstand auf die Zellen gegeben, mit Sequabrene versetzt (1: 20000) und infiziert mit Zentrifugation (30 min, 1100 g). Dieser Schritt wurde nach 12 bis 16 h wiederholt. Transduzierte Zellen wurden anhand der retroviral vermittelten Resistenz gegen Puromycin selektiert (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Hierzu wurden diese 48 h nach der ersten Transduktion in eine  $\text{Ø}6$  cm Schale überführt, circa 7 Tage mit puromycinhaltigem Medium gezüchtet und nach Bedarf gesplittet. Der erfolgreiche „knock down“ des zellulären Proteins wurde mittels Western Blot analysiert.

### **2.2.1.8 MTT-Vitalitäts-Assay**

Um die Vitalität von Zellen nach einer Virusinfektion zu messen, wurden MTT-Tests durchgeführt (Mosmann 1983). Dieser Test beruht auf einem Farbumschlag des wasserlöslichen gelben Substrates MTT, das durch die mitochondriale Aktivität vitaler Zellen zu einem unlöslichen blauen Stoff (Formazan) reduziert wird. Das Maß der Blaufärbung ist dabei direkt proportional mit der Vitalität und kann photometrisch bei 670 bzw. 570 nm gemessen werden.

Hierzu wurden  $1,5 - 2 \times 10^6$  Zellen pro 96-Loch Platte ausgelegt und am darauf folgenden Tag mit einer MOI von 5 TCID<sub>50</sub>/Zelle mit Zentrifugation infiziert. Nach der gewünschten Inkubationsdauer wurde das Medium abgesaugt und durch 100 µl MTT-haltiges Medium ohne FKS (1:10) ersetzt und für 3 - 4 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Medium komplett entnommen, die entstandenen Kristalle in 200 µl Solubilisierungslösung gelöst und letztlich das Ausmaß der Blaufärbung im Photometer bestimmt. Zur Vermeidung von Ungenauigkeiten wurden diese Messungen in acht Ansätzen parallel durchgeführt und die Ergebnisse später gemittelt.

## **2.2.2 Molekulare Methoden**

### **2.2.2.1 Isolierung genomischer DNA mittels Phenol/Choloroform Extraktion**

Zur Isolierung genomischer DNA wurden entweder infizierte pelletierte Zellen ( $5 \times 10^5$  Zellen pro Kavität einer 6-Lochplatte) oder ein Viruspellet benutzt, das wie in Abschnitt 2.2.1.4 beschrieben hergestellt wurde. Zum Aufbrechen des Zellkerns bzw. der Viruspartikel wurde das Pellet in 1 ml Proteinase K Puffer resuspendiert, mit 50 µg/ml Proteinase K versetzt und über Nacht bei 56°C inkubiert, um einen vollständigen Proteinverdau zu gewährleisten. Das verdaute Zelllysat wurde auf zwei Reaktionsgefäße aufgeteilt (je 500 µl), mit der gleichen Menge Phenol/Chloroform (1:1) versetzt und 10 min in einem Überkopfschüttler inkubiert. Zur Trennung der wässrigen und organischen Phase wurde das Gemisch anschließend zentrifugiert (10 min, 16000 g, 4°C) und die obere wässrige Phase vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser Schritt wurde wiederholt. Die letzte Extraktion erfolgte nach dem gleichen Prinzip allerdings wurde hier nur Chloroform verwendet und diente dazu verbliebenes Phenol zu entfernen. Nach Trennung der Phasen durch Zentrifugation wurden die wässrigen Phasen überführt und anschließend vereint. Zur Fällung der DNA wurde das Endvolumen der wässrigen Phase bestimmt und mit 2,5 V 100 % Ethanol (eiskalt!) und 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat versetzt und vorsichtig invertiert, wobei die genomische DNA ausfällt. Die so isolierte hochreine DNA wurde pelletiert (30 min, 17000 g, 4°C) und anschließend mit 70 % Ethanol mit Zentrifugation (10 min, 17000 g, 4°C) gewaschen. Das so

gewonnene DNA Pellet wurde getrocknet und in einem der Pelletgröße angemessenem Volumen an TE-Puffer oder Wasser gelöst.

#### **2.2.2.2 Isolierung von Plasmid- und BAC-DNA mittels alkalischer Lyse („Mini“)**

5 ml LB-Medium (mit entsprechendem Antibiotikum) wurden mit Bakterien, die das zu isolierenden Plasmidkonstrukt trugen, inokuliert und über Nacht bei der benötigten Temperatur aerob gezüchtet. Zur Isolierung von Plasmid-DNA in geringem Maßstab („Plasmid-Mini“) wurde 1,5 ml der Bakterienkultur zentrifugiert (2 min, 6000 g), der Überstand verworfen und das Pellet in 100 µl S1 Puffer resuspendiert. Zur Bakterienlyse wurden 100 µl S2 Puffer hinzu gegeben, kurz invertiert und auf Eis für 5 - 10 min inkubiert. Zur anschließenden Fällung der Proteine wurde das Lysat mit 200 µl S3 Puffer versetzt, kurz invertiert, wiederum 5 - 10 min auf Eis inkubiert und zentrifugiert (10 min, 16000 g, 4°C). Der wässrige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der DNA wurde das Endvolumen (V) des Überstandes bestimmt und dieser mit 0,6 V 100 % Isopropanol versetzt und invertiert. Die DNA wurde mittels Zentrifugation pelletiert (20 min, 16000 g, 4°C), der Überstand verworfen und anschließend mit 70 % Ethanol gewaschen (5 min, 16000 g, 4°C). Das entstandene DNA Pellet wurde getrocknet und in 50 µl einer wässrigen RNaseA-Lösung (100 µg/ml) unter Schütteln bei 37°C gelöst (ca. 30 min). Für einen anschließenden Restriktionsverdau wurden typischerweise 5 µl der resuspendierten Plasmid-DNA benutzt.

Die Isolierung von BAC-DNA in kleinen Mengen („BAC-Mini“) wurde nach dem gleichem Prinzip durchgeführt, allerdings mit kleinen Abweichungen. Zur Pelletierung der Bakterien mit dem gewünschten BAC-Konstrukt wurden insgesamt 4 ml der Übernacht-Kultur (ÜN-Kultur) pelletiert. Die Resuspendierung erfolgte in 200 µl S1 Puffer, die Lyse durch Zugabe von 250 µl S2 und die Proteinfällung letztlich durch hinzugeben von 300 µl S3 Puffer. Die gewaschene BAC-DNA wurde ebenfalls in 50 µl RNaseA-haltiger wässriger Lösung resuspendiert. Restriktionsanalysen wurden anschließend mit 25 µl der DNA-Lösung durchgeführt.

Konzentrationsbestimmungen mit Mini-DNA-Isolierungen sind nicht möglich, da es sich hierbei um keine saubere Isolierungsmethode handelt, sondern lediglich der schnellen Charakterisierung der Plasmid- bzw. der BAC-Konstrukte nach Restriktionsverdau dienen soll.

### **2.2.2.3 Isolierung von Plasmid- und BAC-DNA („Midi“ bzw. „Maxi“)**

Zur Transfektion von Plasmid- und BAC-DNA in eukaryotische Zellen oder für Sequenzierungsreaktionen musste DNA in größerer Menge und in sehr reiner Form isoliert werden. Deswegen wurden zur Isolierung von hochreiner Plasmid-DNA das „NukleoBond® PC 100“ („Midi“) oder das „PC 500“ („Maxi“) Kit benutzt. Hierzu wurde am Tag zuvor LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum versetzt und mit Bakterien inokuliert, die das zu isolierende Konstrukt trugen. Die Kultur wurde aerob über Nacht bei 30° bzw. 37°C gezüchtet. Typischerweise wurde für eine Midi-Isolierung von Plasmid-DNA ein Volumen von 50 - 100 ml benutzt. Im Falle einer Maxi-Isolierung von Plasmid-DNA wurde ein Volumen von 100 - 150 ml Kultur eingesetzt. Für eine BAC-Midi-Isolation wurde das „NukleoBond® Xtra Midi“ Kit verwendet. Das eingesetzte Volumen der Übernachtskultur betrug 100 - 150 ml.

Die Isolierung der DNA mit den entsprechenden Kits wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und folgt dem Prinzip der alkalischen Lyse. Allerdings werden die gefällten Proteine hierbei mit Hilfe eines Filters entfernt und die DNA wird an eine Anionenaustausch-Matrix gebunden. Nach dem Waschen dieser Matrix wird die gebundene DNA wieder eluiert, gefällt mit 100 % Isopropanol (30 min, 17000 g, 4°C) und mit 70 % EtOH gewaschen (10 min, 17000 g, 4°C). Nachdem das DNA-Pellet getrocknet war, wurde es in einem der Pelletgröße entsprechendem Volumen an TE-Puffer oder Wasser aufgenommen und die Konzentration konnte anschließend photometrisch bestimmt werden.

### **2.2.2.4 Bestimmung der DNA Menge**

Die Konzentration der isolierten DNA wurde mit Hilfe des Nanodrop-Photometers bestimmt. Eingesetzt wurden jeweils 2 µl der zu bestimmenden DNA-Probe. DNA besitzt ein typisches Absorptionsmaximum bei 260 nm; Proteine im Gegensatz dazu bei 280 nm. Durch Messung dieser beiden Werte lässt sich so die DNA-Konzentration und gleichzeitig der Reinheitsgrad bzw. der Anteil der Proteinverunreinigung messen, wobei eine optische Dichte von 1 einer DNA Konzentration von 50 µg/ml entspricht. Der Reinheitsgrad errechnet sich aus dem Quotienten  $OD_{260}/OD_{280}$ . Eine reine DNA Isolierung hat typischerweise einen Quotienten zwischen 1,8 und 2.

### **2.2.2.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und Sequenzierung**

Um ein Gen zu klonieren oder um eine BAC-Rekombination durchführen zu können, wurde hierzu das jeweils benötigte DNA-Fragment mit Hilfe einer PCR synthetisiert. Hierfür wurde je nach verwendeter DNA-Polymerase nach Herstellerangaben ein PCR-Ansatz pipettiert. Für

die eigentliche PCR wurde ein Thermocycler-Gerät genutzt, wobei ein typisches PCR-Profil wie folgt aussah:

<b>Denaturierung</b>	<b>Hybridisierung</b>	<b>Elongation</b>	<b>Lagerung</b>
1 x 95°C, 5 min			
30 x 95°C, 30 sec	$T_m - 5^\circ\text{C}$ , 30 sec	72°C, 1-2 min/kb	
1 x 95°C, 30 sec	$T_m - 5^\circ\text{C}$ , 30 sec	72°C, 10 min	4°C, $\infty$

Änderungen der initialen Denaturierungsdauer, der Hybridisierungstemperatur ( $T_m$ ) und der Elongationszeit ergaben sich in Abhängigkeit von der verwendeten Polymerase und des jeweiligen Primerpaares. Die Berechnung des  $T_m$ -Wertes der verwendeten Primer wurde wie in Abschnitt 2.1.6 beschrieben durchgeführt. Zur Berechnung des  $T_m$ -Wertes für Rekombinationsprimer wurde nur der jeweils in der PCR homologe Teil des Primers verwendet. Die Analyse der PCR-Reaktion erfolgte elektrophoretisch in einem 1 % Agarosegel (vgl. Abschnitt 2.2.2.7)

Sequenzierungsreaktionen wurden nach Herstellerangaben unter Verwendung des „ABI BigDye Terminators v3.1 Cycle Sequencing“ Kit angesetzt und nach einem feststehenden Programm durchgeführt:

<b>Denaturierung</b>	<b>Hybridisierung</b>	<b>Elongation</b>	<b>Lagerung</b>
1 x 96°C, 5 min			
25-45 x 96°C, 10 sec	$T_m - 5^\circ\text{C}$ , 5 sec	60°C, 4 min	4°C, $\infty$

Zur Sequenzierung genomischer DNA bzw. BAC-DNA wurden pro Ansatz 1,5  $\mu\text{g}$  DNA verwendet, wobei diese in Wasser gelöst sein musste. Sollte Plasmid-DNA bzw. ein PCR-Fragment sequenziert werden wurden lediglich 150 - 300 ng bzw. 1 - 10 ng pro Ansatz verwendet. Die Hybridisierungstemperatur veränderte sich dabei in Abhängigkeit des verwendeten Sequenzierungsprimers. Durchgeführt wurden die Sequenzierungsansätze im hauseigenen Sequenzierungslabor.

Die Genomsequenzierung von MCMV/h wurde mit Hilfe isolierter Virion-DNA (vgl. 2.2.2.1) von der Sequenzierungsfirma Macrogen Inc. (Seoul, South Korea) durchgeführt.

### **2.2.2.6 RealTime-PCR Analysen**

Die RealTime-PCR stellt eine sehr sensitive Methode zur Quantifizierung geringer DNA Mengen in einer Probe dar und wurde zur Messung der Genomkopien in infizierten Zellen genutzt. Hierbei wurde der „Power SYBR Green PCR Master Mix“ verwendet (Volumen pro

Ansatz: 25 µl). Hierzu wurden  $2,5 \times 10^5$  Zellen pro Kavität einer 6-Loch-Platte in Triplikaten ausgesät und am Tag danach mit einer MOI von 0,5 TCID<sub>50</sub>/Zelle infiziert. Zur Ernte wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst, pelletiert und die DNA anschließend mit dem „DNeasy® Blood and Tissue Kit“ über eine Säulenmatrix nach Herstellerangaben isoliert. Zur PCR-Reaktion wurden Primerpaare verwendet, die spezifisch MCMV *ie1* und zelluläres *c-myc* amplifizierten. Um die Genomkopienzahl bestimmen zu können wurden jeweils eine *c-myc*- und eine *ie1*-Standardreihe mit Hilfe von Plasmiden erstellt, in die die jeweiligen PCR-Fragmente kloniert waren. Die Plasmidkopienzahl errechnete sich aus der jeweiligen Größe des Konstruktes. Alle Infektionen wurden hierbei in Triplikaten angesetzt und die Ergebnisse letztlich gemittelt.

#### **2.2.2.7 DNA-Gelelektrophorese und BAC-Gele**

Zur Analyse von PCR-Produkten, zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten und zur Analyse eines Restriktionsverdauens nach Klonierungen wurden kleine oder mittelgroße horizontale Gelelektrophoresen mit Hilfe von 0,6 - 2 % TAE-Agarosegelen durchgeführt. Hierzu wurde die entsprechende Menge an Agarose abgewogen und in dem benötigten Volumen an 1 x TAE Puffer durch aufkochen gelöst. Vor dem Gießen des Gels wurde die etwas abgekühlte Agarose mit Ethidiumbromid (1:20000) versetzt. Nach dem Erstarren des Geles wurde es in die entsprechende Gelkammer gelegt, komplett mit 1 x TAE Laufpuffer bedeckt und beladen, wobei die Proben in 6 x Ladepuffer aufgenommen wurden. Standardmäßig erfolgte die elektrophoretische Trennung der DNA-Fragmente bei 130 V bis zur benötigten Auflösung. Durch Bestrahlung des Geles mit Hilfe eines UV-Transilluminators (312 nm Wellenlänge) konnte die DNA sichtbar gemacht und mit Hilfe einer Digitalkamera dokumentiert werden. DNA-Fragmente, die für weitere Klonierungen bzw. Rekombinationen benötigt wurden, konnten so auch lokalisiert und aus dem Gel ausgeschnitten werden.

Um komplexe Restriktionsmuster zu analysieren, wie sie z.B. nach einem BAC Verdau entstehen, wurden Maxi-Agarosegele gegossen. Hierbei wurden standardmäßig 0,6 % TBE-Agarosegele verwendet, die nach dem gleichen Prinzip wie TAE-Gele hergestellt wurden. Die elektrophoretische Auftrennung der sehr unterschiedlich großen DNA-Fragmente erfolgte in zwei Teilschritten. Zur Analyse der kleineren DNA-Fragmente wurde die elektrophoretische Auftrennung über Nacht bei 45 - 55 V vollzogen. Nach Dokumentation der kleineren Banden erfolgte je nach Bedarf eine schnellere Auftrennung bei 130 V für weitere 3 - 5h. Hierbei kommt es zu einer starken Auftrennung der großen Fragmente, wobei allerdings die kleineren Fragmente aus dem Gel laufen. Deshalb ist eine vorherige Dokumentation dieser Fragmente unumgänglich.

#### **2.2.2.8 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel bzw. einer PCR**

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel oder aus einer PCR-Reaktion erfolgte mit dem „NukleoSpin<sup>®</sup> Extract II“ Kit nach Herstellerangaben. Hierzu wurde das gewünschte DNA-Fragment nach elektrophoretischer Auftrennung in einem Agarosegel ausgeschnitten, mit der entsprechenden Menge an Bindepuffer versetzt und unter Schütteln bei 50°C inkubiert, wobei sich die Agarose auflöst und die DNA in die wässrige Phase übergeht. Zur Aufreinigung einer PCR-Reaktion wurde diese ebenfalls mit dem Bindepuffer versetzt, wobei allerdings die Inkubation bei 50°C nicht nötig war. Die Aufreinigung der DNA erfolgt hierbei ebenfalls über eine Anionenaustausch-Matrix, an die die zu reinigende DNA bindet, gewaschen wird und anschließend im gewünschten Volumen eluiert werden kann.

#### **2.2.2.9 Restriktionsverdau und Ligation**

Zur Analyse von BAC-Konstrukten, zur Klonierung oder zum Ausschneiden von bestimmten DNA-Sequenzen wurden Restriktionen und Ligationen durchgeführt (Sambrook et al. 1989). Je nach Fragestellung, wurden 1 - 5 µg DNA mit dem jeweiligen Enzym (10 - 30 Units) und dem entsprechenden Puffer bei optimaler Temperatur für circa 2 h verdaut. Die Analyse der Fragmente erfolgte mittels Gelelektrophorese. Falls notwendig konnten die benötigten Banden aus dem Agarosegel eluiert und anschließend über passende Schnittstellen in einen zuvor restringierten Vektor ligiert werden. Ligationen wurden bei 16°C über Nacht bzw. 1 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Das molare Verhältnis von Vektor/Insert betrug hierbei 1:3 bis 1:7. Anschließend wurde mit 1 - 3 µl des Ligationsansatzes eine Elektroporation durchgeführt (vgl. Abschnitt 2.2.2.13) und die transformierten Bakterien entsprechend selektioniert.

#### **2.2.2.10 Herstellung elektrokompenter Bakterien**

Zur Elektroporation von Plasmiden oder linearen DNA-Fragmenten zur Rekombination wurden elektrokompente Bakterienzellen hergestellt. Hierzu wurde am Tag zuvor eine 5 ml ÜN-Kultur des jeweiligen Bakterienstammes, ausgehend von einer Einzelkolonie und falls nötig mit Antibiotikum, bei der entsprechenden Temperatur unter aeroben Bedingungen angesetzt. Ausgehend hiervon wurden am nächsten Tag 100 ml LB-Medium, falls nötig wiederum mit Antibiotikum, mit 1 % der ÜN-Kultur beimpft und unter den benötigten Bedingungen aerob inkubiert, bis die Bakterien eine optische Dichte bei 600 nm ( $OD_{600nm}$ ) von ca. 0,6 erreicht hatten. Zur Bestimmung wurde jeweils 1 ml der Kultur entnommen und die  $OD_{600nm}$  photometrisch bestimmt.

Bakterien des Stammes DH10B wurden bei 37°C aerob gezüchtet, nach Erreichen der gewünschten  $OD_{600nm}$  in einem Eiswasserbad auf 4°C für ca. 30 min abgekühlt und

anschließend pelletiert (15 min, 5000 g, 4°C). Das Bakterienpellet wurde in 100 ml sterilem 10 % Glycerol resuspendiert und anschließend wieder pelletiert (15 min, 5000 g, 4°C). Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Anschließend erfolgte ein Waschschrift mit den gleichen Bedingungen mit 100 ml eiskaltem sterilen Wasser. Nach Pelletierung der Bakterien wurden diese in 1 ml eiskaltem 10 % Glycerol resuspendiert, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die so hergestellten Bakterien konnten bis zur Verwendung bei -80°C gelagert werden.

#### **2.2.2.11 Herstellung rekombinationskompetenter Zellen**

Wurden elektrokompetente Bakterien des Stammes Dy380 bzw. SW102 für eine BAC-Rekombination hergestellt, musste hierzu das Rekombinationssystem induziert werden. Da das Rekombinationssystem bei 42°C induziert wird, war es nötig die Bakterien bei 30°C zu züchten um eine ungewollte Expression zu verhindern. Nach Erreichen der OD<sub>600nm</sub> 0,6 erfolgte dann zur Induktion der Rekombinationsenzyme ein Hitzeschockschritt. Hierzu wurde die Bakterienkultur in einem 42°C Wasserbad unter Schütteln exakt 15 min inkubiert und anschließend sofort in einem Eiswasserbad ca. 30 min abgekühlt. Die Bakterien wurden, wie bereits für elektrokompetente Zellen beschrieben, zweimal mit 10% Glycerol gewaschen, einmal mit Wasser, anschließend aliquotiert und schockgefroren (vgl. Abschnitt 2.2.2.10). Die so für eine Rekombination hergestellten Bakterien konnten ebenfalls bis zur Verwendung bei -80°C gelagert werden.

#### **2.2.2.12 Lagerung von Bakterienkulturen (Stammsammlung)**

Um Bakterienkulturen langfristig bei -80°C zu lagern, war es nötig Glycerol-Kulturen herzustellen. Hierzu wurde eine 5 ml ÜN-Kultur des jeweiligen Stammes bzw. Klones mit entsprechendem Konstrukt in LB-Medium und falls nötig mit Antibiotikum angesetzt und über Nacht bei aeroben Bedingungen inkubiert. Am nächsten Tag wurden hiervon 600 µl mit 800 µl 80 % Glycerol vermischt und bei -80°C zur Lagerung weggefroren. Sollten hiervon wieder Kulturen angesetzt werden, wurde unter sterilen Bedingungen etwas gefrorene Kultur auf LB-Agar-Platten ausgestrichen und zur Kultivierung inkubiert.

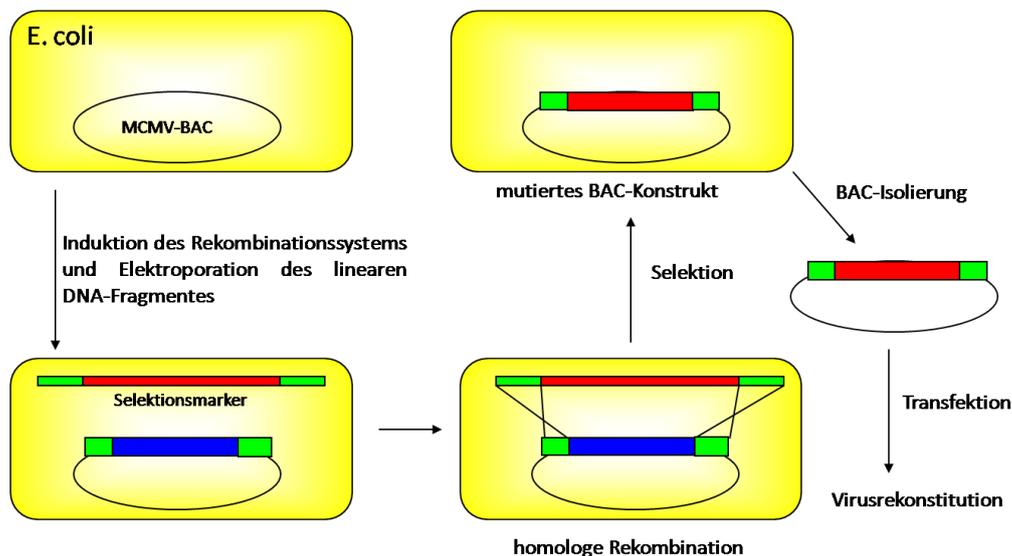
#### **2.2.2.13 Elektroporation**

Zur Elektroporation von Plasmiden oder Ligationsansätzen wurden elektrokompetente DH10B Zellen auf Eis aufgetaut. Pro Elektroporation wurden 50 µl Bakterien verwendet. Diese wurden mit 1 - 100 ng Plasmid/BAC-DNA bzw. 1 - 3 µl Ligationsansatz vermischt und in eine kalte 2 mm-Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation wurde standardmäßig im „Gene Pulser XCell“ mit 2,5 kV durchgeführt. Die Bakterien wurden

anschließend mit 800 µl warmen LB Medium aus der Küvette in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 37° bzw. 30°C für 1,5 - 2 h aerob inkubiert. Danach wurden 100 µl der elektroporierten Kultur auf LB-Agar mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und bis zum Wachstum der Kolonien bei der benötigten Temperatur inkubiert.

### 2.2.2.14 MCMV-BAC Mutagenese

Die Mutagenese mit Hilfe von künstlichen Bakterienchromosomen („bacterial artificial chromosome“, BAC) ist eine schnelle und effiziente Methode, um Virusmutanten zu generieren, wobei man sich hierbei der gut charakterisierten Rekombinationssysteme in Bakterien bedient. Die hier beschriebenen Mutagenesen wurden alle mit Hilfe der BAC-Technologie durchgeführt (Brune et al. 2001) und beruhen auf dem MCMV-GFP-BAC-Wildtyp-Konstrukt (MCMV/wt).



**Abbildung 3: Schema der BAC-Rekombination in Bakterienzellen.** Durch Induktion des Rekombinationssystems und Elektroporation eines linearen DNA-Fragmentes (rot) mit Homologiebereichen (grün) kann eine homologe Rekombination stattfinden. Klone mit erfolgreicher Rekombination können über den eingebauten Selektionsmarker auf entsprechendem Medium selektioniert werden. Die Virusrekonstitution aus dem mutierten BAC-Konstrukt erfolgt nach Isolierung und Transformation in eukaryontische Zellen.

Um eine BAC-Rekombination durchzuführen, wird zunächst ein PCR-Fragment mit Selektionsmarker konstruiert, das an beiden Enden homologe Bereiche zur Position des Mutagenesebereiches besitzt (vgl. Abbildung 3). Dieses Fragment wird in rekombinationskompetente Bakterien elektroporiert und diese können dann auf LB-Selektionsagar plattiert und selektioniert werden. Die erhaltenen Klone werden zum Anlegen einer ÜN-Kultur verwendet und mittels BAC-Isolierung und Restriktionsverdau analysiert. Erfolgreiche Rekombinationen bringen meist eine Änderung im Restriktionsbandenmuster

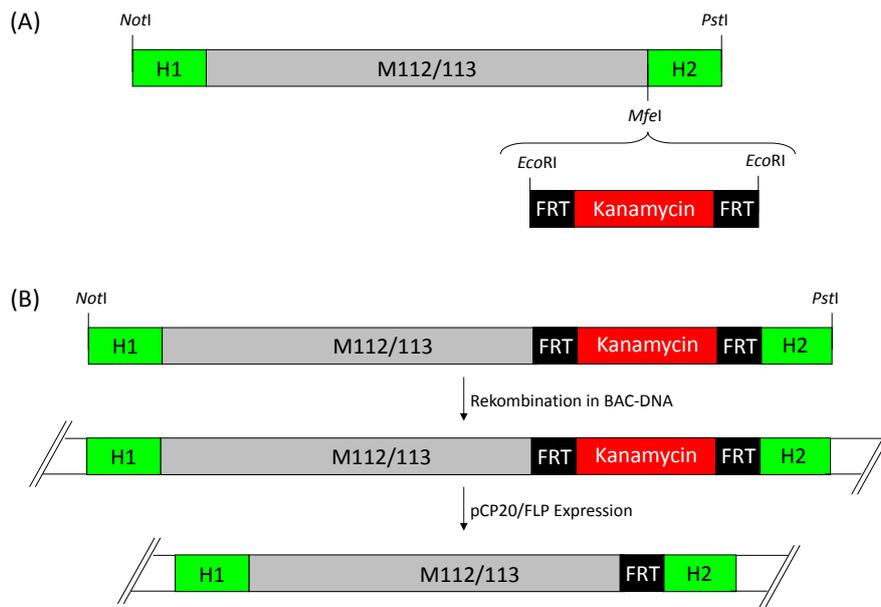
mit sich, weshalb eine vorherige Analyse des geeigneten Enzyms zur Rekombinationkontrolle unabdingbar ist.

#### 2.2.2.14.1 BAC-Rekombination mit Hilfe des FRT-Kan-Systems

Die detektierten Mutationen im Genbereich M112/113 in MCMV/h wurden in den MCMV/wt-BAC mit Hilfe des FRT-Kanamycin-Selektionsmarkers eingebaut. Hierzu wurde der gesamte wildtyp bzw. der mutierte Genbereich von M112/113 (pos. 163097-165079) (Rawlinson et al. 1996) in einer PCR-Reaktion amplifiziert. Über die verwendeten Primer M112\_Not\_fw und M113\_Pst\_Mfe\_revII wurden die benötigten 50 bp-Homologiebereiche in das Fragment eingebaut und gleichzeitig die Schnittstellen für *NotI*, *PstI* und *MfeI*. Über *NotI* und *PstI* wurde das Fragment in das Plasmid pBlueScript II KS<sup>+</sup> kloniert und anschließend sequenziert. Die Kanamycinresistenz-Kassette mit den flankierenden FRT-Sequenzen wurde aus dem Plasmid pSLFRT-kan mit Hilfe des Enzyms *EcoRI* ausgeschnitten und über die eingebaute *MfeI* Schnittstelle an das 3'-Ende des codierenden Bereich von M112/113 kloniert (Abbildung 4). Dieses Konstrukt wurde in Bakterien vermehrt und wieder isoliert. Anschließend wurde das Plasmid mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *PstI* verdaut und die entstandenen Fragmente elektrophoretisch getrennt. Die Bande, die den codierenden Bereich von M112/113 flankiert von den Homologiebereichen enthält, wurde aus dem Gel eluiert und für eine Elektroporation genutzt (Abbildung 4).

Rekombinationskompetente Bakterien des Stamms Dy380, die den MCMV/wt-BAC trugen, wurden mit ca. 200 ng des gereinigten M112/113-Fragmentes mit wildtyp oder mutierter M112/113 Sequenz elektroporiert, in LB-Medium überführt, 3 h unter Schütteln inkubiert und schließlich auf LB-Kanamycin Platten ausgestrichen. Nach zwei Tagen Inkubation bei 30°C konnten so Klone erhalten werden. Die erfolgreiche Rekombination wurde mittels BAC-Isolierung und Restriktionsverdau überprüft.

Im zweiten Schritt der Mutagenese wurde die Kanamycin-Resistenz über die vorhandenen FRT-Sequenzen eliminiert, wobei eine Insertion von 32 Nucleotiden im Genom zurückbleibt. Hierzu wird die so genannte FLP-Rekombinase benötigt, die von dem temperatursensitiven Plasmid pCP20 codiert wird (Abbildung 4). Stabil wird dieses Konstrukt nur bei 30°C weitergegeben. Die Expression der FLP-Rekombinase und der Verlust des Plasmids erfolgt durch Zucht der Bakterien bei 42°C. Da die oben beschriebene Rekombination in Dy380 durchgeführt wurde und diese bei 30°C gezüchtet werden müssen, um die Expression der Rekombinationsenzyme zu unterdrücken, war ein Wechsel in den Bakterienstamm DH10B von Nöten.



**Abbildung 4: Generierung des Rekombinationsfragmentes zur Mutagenese des M112/113-Genbereiches in MCMV/wt.** (A) Schematische Darstellung des linearen PCR-Fragmentes mit Homologiebereichen und der wt bzw. der mutierten M112/113-Gensequenz. Nach der Sequenzierung wurde die Kanamycin-Kassette in dieses Konstrukt kloniert. (B) Rekombinationsfragment nach Restriktion aus pBlueScript II KS<sup>+</sup>\_M112/113-Kan. Nach Selektion der richtigen Klone wurde die Kanamycin-Kassette mit Hilfe des Plasmids pCP20 wieder entfernt. Zurück blieb hierbei nur eine der beiden FRT-Stellen.

Hierzu wurde von einem Klon mit richtigem Konstrukt BAC-DNA isoliert und diese wurde in kompetente DH10B elektroporiert und mittels Verdau erneut überprüft. Danach erfolgte die Elektroporation des Plasmids pCP20. Die Bakterien wurden danach bei 30°C bebrütet und über Chloramphenicol- und Ampicillinresistenz selektioniert. Klone, die beide Konstrukte trugen, wurden auf LB-Chloramphenicol-Agar-Platten ausgestrichen und bei 42°C über Nacht inkubiert. Erhaltene Klone wurden erneut auf LB-Chloramphenicol-Agar-Platten ausgestrichen und nochmals über Nacht bei 42°C inkubiert. Bei dieser Temperatur wird die FLP-Rekombinase exprimiert, was somit zum Verlust der Kanamycin-Resistenz führt. Gleichzeitig wird das Plasmid nicht mehr repliziert und geht verloren. Anschließend wurden die Klone auf Kanamycin- und Ampicillinsensitivität getestet, wobei letztlich beide Resistenzen nicht mehr vorhanden sein sollten. Der Verlust der Kanamycin-Kassette wurde ebenfalls wieder mit Hilfe eines BAC-Restriktionsverdau überprüft. Von den richtigen Konstrukten wurden zwei zur Virusrekonstitution ausgewählt.

Diese Methode der BAC-Mutagenese trägt den Nachteil, dass eine Insertion von 32 Nukleotiden bei Elimination der Kanamycin-Kassette zurückbleibt. Einen Einfluss dieser Insertion auf benachbarte Genbereiche oder andere Transkriptionsvorgänge (z. B. Spleißen) kann nicht vollständig ausgeschlossen werden. Deshalb wurden alle weiteren Mutanten mit einem anderen Selektionsmarker hergestellt, wobei das Prinzip der homologen

Rekombination erhalten bleibt. Außerdem können mit diesem System nur eine limitierte Anzahl an Mutationen in denselben BAC eingeführt werden, da über die zurückbleibenden FRT-Sequenzen ebenfalls Rekombinationen möglich sind und dementsprechend ungewollte und womöglich umfassende Deletionen eingebaut werden können.

#### 2.2.2.14.2 BAC-Rekombination mit Hilfe des *Galk*-Systems

Die in MCMV/h gefundene Mutation im Genbereich M116 wurde mit dem *Galk*-System in die verschiedenen BAC-Konstrukte eingebaut (Warming et al. 2005). BAC-Rekombinationen mit Hilfe des *Galk*-Systems nutzen das *Galk*-Gen als Selektionsmarker und den Bakterienstamm SW102 zur Rekombination. Das *Galk*-Gen kodiert für die Galakto-Kinase. Dieses Enzym ist notwendig zur Phosphorylierung von Galaktose, um diese danach dem Stoffwechsel zuzuführen um so als Kohlenstoffquelle zu dienen. Der Stamm SW102 ist defizient für *Galk* und kann folglich nicht auf einem Minimalmedium wachsen, das einzig Galaktose als Kohlenstoffquelle enthält.

Im ersten Schritt der Mutagenese wird das *Galk*-Gen in die Bakterien rekombiniert und diese können nach erfolgreicher Rekombination auf einem *Galk*-Minimalmedium wachsen und so selektioniert werden. Zunächst war es hierzu nötig die zu mutierenden BAC-Konstrukte in SW102 Zellen zu überführen. Hierzu wurden kompetente Bakterien dieses Stammes mit frisch isolierter BAC-DNA elektroporiert und auf LB-Chloramphenicol-Agar Platten selektioniert. Die Integrität der BACs wurde wiederum durch Restriktionsanalyse bestätigt.

Das *Galk*-Gen liegt kloniert im Plasmid *pGalk* vor und wurde über die entsprechenden Primersequenzen mit Hilfe einer PCR-Reaktion amplifiziert. Gleichzeitig wurden die Primer so konstruiert, dass das PCR-Fragment von den Homologiebereichen flankiert wird, über die die Rekombination stattfinden soll. Das Ursprungsplasmid wurde durch einen *DpnI*-Verdau entfernt und das PCR-Produkt gereinigt. 200 - 500 ng des gereinigten Fragmentes wurden in rekombinationskompetente SW102 mit BAC-Konstrukt elektroporiert und anschließend in LB-Medium bei 30°C aerob für 2,5 h inkubiert um eine erfolgreiche Rekombination zu gewährleisten. Anschließend wurden die transformierten Bakterien pelletiert (5000 g, 2 min) und das LB-Medium verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml M9 Medium resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt. Anschließend wurden hiervon 100 µl auf M63-Minimalmediumplatten plattiert und die verbleibenden Bakterien wieder zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl M9 Medium resuspendiert und diesmal komplett auf M63-Minimalmediumplatten ausgestrichen. Die Inkubation der Bakterien erfolgte bei 30°C. Kolonien wurden meist erst nach 5 - 6 Tagen sichtbar.

Die entstandenen Klone wurden mit Hilfe eines BAC-Restriktionsverdau überprüft und zusätzlich durch Ausstreichen auf MacConkey-Platten. Diese Platten enthalten Galaktose und einen pH-Indikator. Bakterien, die rekombiniert haben und somit ein funktionelles *Galk*-Gen besitzen, bilden nach Inkubation über Nacht bei 30°C stark pinkfarbene Kolonien aus und können sehr gut von nicht funktionellen oder falschen Klonen unterschieden werden, da diese weiße Kolonien bilden. Von Klonen, die für beide Analysen positiv waren, konnten nun wieder rekombinationskompetente Zellen hergestellt werden.

Um die gewünschte Mutation in einer zweiten Rekombination einzubauen, wurde wiederum ein PCR-Fragment mit den gleichen flankierenden Homologien wie im ersten Fragment benötigt. Hierzu wurde mit den entsprechenden Primern aus MCMV/wt-BAC- bzw. aus MCMV/h-Virion-DNA ein PCR-Fragment generiert, das nach Aufreinigung für die zweite Rekombination genutzt wurde. Dieser zweite Schritt wurde im Prinzip wie der erste Schritt durchgeführt. Nach der Elektroporation des linearen Fragmentes (ca. 200 ng) wurden die Bakterien allerdings in 10 ml LB ohne Antibiotikum für 4,5 h aerob inkubiert. Hiervon wurde 1 ml entnommen und wie beschrieben dreimal mit M9 gewaschen. Anschließend wurden die gleichen Mengen auf M63/DOG-Minimalplatten ausplattiert und für ca. 5 Tage bei 30°C bebrütet. Das *Galk*-Gen dient in diesem Schritt der Negativselektion. In den M63/DOG-Minimalplatten befindet sich Deoxy-Galaktose (DOG). Eine erfolgreiche Rekombination führt zum Verlust des *Galk*-Gens und zum Einbau der Mutation im gewünschten Bereich. Bakterien, die nicht oder falsch rekombiniert haben, besitzen immer noch das *Galk*-Gen. Das DOG wird von *Galk*-positiven Bakterien phosphoryliert, wodurch es zum toxischen Stoffwechselprodukt wird und die Zellen sterben. Bakterien, die dagegen erfolgreich rekombiniert haben, besitzen anstelle des *Galk*-Gens die inserierte Sequenz und können somit auch kein DOG mehr phosphorylieren. Sie wachsen aufgrund des im Medium enthaltenen Glycerols. Die erhaltenen Kolonien wurden wie gewöhnlich mit einem BAC-Restriktionsverdau überprüft. Hierbei sollte sich wieder das ursprüngliche parentale Restriktionsmuster zeigen, da keine zusätzlichen Sequenzen eingebaut wurden oder zurückbleiben. Deshalb war es nötig, die nach diesem System mutierte BAC-DNA im modifizierten Bereich zu sequenzieren, um die eingebauten Punktmutationen zu bestätigen.

#### 2.2.2.14.3 BAC-Rekombination mit Hilfe des *Galk*-Kan-Systems

Die Rekombination mit diesem System folgt dem Prinzip wie in Abschnitt 2.2.2.14.2 beschrieben. Da hierbei der erste Selektionsschritt mehrere Tage dauert, wurde das System verbessert, indem ein Kanamycin-Resistenzgen hinter das *Galk*-Gen im Plasmid *pGalk* kloniert wurde. Durch Verwendung der entsprechend veränderten Homologieprimer entsteht

ein PCR-Fragment, das neben dem *Galk*-Gen noch das Kanamycin-Resistenzgen trägt. Das heißt, dass nach Elektroporation des PCR-Fragmentes eine Selektion auf LB-Kanamycin-Agar-Platten möglich war und Kolonien meist schon nach einer Inkubation über Nacht bei 30°C pickbar waren; spätestens jedoch nach zwei Tagen. Da hierdurch Zeit gespart werden konnte, wurden alle anderen Mutagenesen mit diesem System durchgeführt. Der zweite Selektionsschritt auf M63/DOG-Minimalplatten musste jedoch wie unter Abschnitt 2.2.2.14.2 beschrieben durchgeführt werden und konnte nicht beschleunigt werden.

#### **2.2.2.15 Gezielter Einbau von Punktmutationen mit Hilfe der „Quikchange PCR“**

Zum zielgerichteten Einbau von Punktmutationen in plasmidcodierte Gene wurde das „Quikchange II site directed mutagenesis“ Kit von Stratagene verwendet. Hierfür wurden Mutageneseprimer mit dem entsprechenden Nukleotidaustausch synthetisiert und für eine Mutagenese-PCR nach Herstellerangaben eingesetzt. Als Vorlage diente hierbei die Genregion M112/113 aus pBlueScript II KS+\_M112/113 (vgl. Abschnitt 2.2.2.14.1), nachdem diese in das Plamid pFlagCMV5a subkloniert wurde. Nach dem *DpnI*-Verdau zur Entfernung des methylierten Originalplasmids, wurde 1 µl der Mutagenese-PCR genutzt, um elektrokompetente DH10B Zellen zu transformieren. Nach Regenerierung in 800 µl LB-Medium bei 37°C (1,5 h) wurden verschiedene Mengen Bakteriensuspension auf LB-Ampicillin-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Aus den erhaltenen Kolonien wurden in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin ÜN-Kulturen angelegt und am nächsten Tag für eine Plasmid-Isolation verwendet. Das isolierte Plasmid wurde im zu mutierenden Bereich sequenziert, um zu prüfen, ob die Punktmutation tatsächlich vorhanden war. Dieses mutierte Plasmid diente anschließend als Grundlage zur Synthese eines Rekombinationsfragmentes, welches letztlich in einer BAC-Mutagenese eingesetzt wurde.

#### **2.2.2.16 „Southern Slot Blot“**

Zur Analyse der Replikationsfähigkeit von MCMV/wt bzw. MCMV/h wurde parallel zu den Wachstumskurven ein „Southern Slot Blot“ mit Hilfe des „Dig High Prime Labelling and Detection Starter Kit II“ durchgeführt.

Hierfür wurden  $5 \times 10^5$  RPE-1-Zellen pro Kavität einer 6-Loch-Platte ausgesät und am Tag danach mit einer MOI von 5 TCID<sub>50</sub>/Zelle infiziert. Nach der gewünschten Infektionsdauer wurde genomische DNA wie in Abschnitt 2.2.2.1 beschrieben isoliert. Je 1 µg genomische DNA wurden in 6 x SSC (Endvolumen 50 µl) bei 100°C für 10 min denaturiert, dann sofort auf Eis abgekühlt und anschließend unter Vakuum und mit Hilfe der SlotBlot-Apparatur auf eine positiv geladene Nylonmembran überführt. Die jeweiligen Slots wurden nochmals mit 500 µl 6 x SSC gewaschen um DNA-Reste in der Apparatur auf die Membran zu übertragen.

Anschließend wurde die Membran getrocknet und die DNA mit einem „UV-crosslinker“ fixiert. Als Sonde wurde ein 2,8 kb großes Teilfragment des M45 Gens von MCMV verwendet. Dieses wurde aus dem Plasmid pcDNA\_M45 mittels PCR amplifiziert, aufgereinigt und nach Herstellerangaben mit Digoxigenin-dUTP markiert. Die Sonde wurde denaturiert (5 min, 95°C) und anschließend für die Hybridisierung über Nacht bei 42°C verwendet. Am nächsten Tag wurde die Membran 2 x 5 min mit 2 x SSC/0,1 % SDS und anschließend 2 x 15 min mit 0,5 x SSC/0,1 % SDS (65°C) gewaschen. Zur Detektion des Signals wurde die Membran kurz mit Detektionswaschpuffer gespült, 30 min in Blockierungspuffer inkubiert und anschließend für weitere 30 min in die Digoxigenin-spezifische Antikörperlösung (1:20000) überführt. Um unspezifische Signale zu vermeiden wurde die Membran mit Waschpuffer gewaschen (2 x 15 min) und danach 5 min in Detektionspuffer äquilibriert. Nach Überschichten der Membran mit Detektionslösung (CSPD) konnten durch Auflegen eines Röntgenfilms spezifische Signale detektiert werden. Zum Entwickeln der Filme wurde die Röntgenfilm-Entwicklermaschine (Kodak) verwendet.

### **2.2.3 Proteinbiochemische und immunologische Methoden**

#### ***2.2.3.1 Herstellung von Zelllysaten und Bestimmung der Proteinmenge***

Zur Herstellung von Zelllysaten wurden die Zellen zuvor in 6-Loch-Platten ausgesät ( $5 \times 10^5$  Zellen pro Kavität) und falls nötig infiziert (vgl. Abschnitt 2.2.1.5). Zum zu untersuchenden Zeitpunkt wurde das Zellkulturmedium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und in der Zellkulturschale auf Eis mit je 160 µl Lysepuffer pro Kavität einer 6-Loch-Platte für 15 min lysiert. Sollten hauptsächlich cytosolische Proteine analysiert werden, wurde der TritonX-Lysepuffer verwendet. Zur Analyse von cytosolischen und Zellkernproteinen wurde der stärkere RIPA-Puffer verwendet, der auch zur Lyse der Zellkerne führt. Beide Lysepuffer sind vor Benutzung mit Proteaseinhibitoren versetzt worden. Nach dem Lysieren wurden die Zelltrümmer mit einem Zellkulturschaber gelöst und zusammen mit dem Lysepuffer in ein Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Zelltrümmer mittels Zentrifugation (20 min, 16000 g, 4°C) pelletiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. 20 µl von jeder Probe wurden entnommen und der Proteingehalt mit Hilfe des „BCA Protein Assay“ Kits nach Herstellerangaben in Duplikaten bestimmt. Der Proteingehalt errechnete sich hierbei mit Hilfe einer mitgeführten BSA-Standardreihe. Das restliche Zelllysate wurde mit dem gleichen Volumen an 2 x Proteinprobenpuffer versetzt, aufgeköcht (5 min, 95°C) und letztlich auf Eis abgekühlt. Das aufgeköchte Lysat konnte sofort verwendet werden. Alternativ war eine längerfristige Lagerung bei -20°C möglich. Standardmäßig wurden 15 - 20 µg Gesamtprotein in der SDS-PAGE zur Analyse eingesetzt.

### 2.2.3.2 SDS-PAGE und Western Blot

Zur Auftrennung von Proteinen in einem Zelllysate wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Hierzu wurden 8 - 10 % Gele im „Mini-Protean 3 Cell“ System nach folgendem Protokoll gegossen:

	Trenngel		Sammelgel
	8% [ml]	10% [ml]	4% [ml]
Wasser	4,7	4,1	6,1
Rotiphorese Gel 30	2,7	3,3	1,3
0,5 M Tris pH 6,8	-	-	2,5
1,5 M Tris pH 8,8	2,5	2,5	-
20% SDS	0,05	0,05	0,05
10% APS	0,1	0,1	0,05
TEMED	0,05	0,05	0,01

Das Trenngel wurde nach dem Gießen vorsichtig mit Wasser überschichtet. Nach dem Aushärten wurde dieses entfernt, anschließend das Sammelgel gegossen und die Taschen mit Hilfe eines passenden Kamms geformt. Das Gel wurde in die Laufvorrichtung eingespannt und diese mit Laufpuffer gefüllt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 120 V, wobei die Dauer je nach Auftrennungsstärke variierte.

Nach der Auftrennung wurden die Proteine mit Hilfe des Semidry Blotters auf eine Nitrocellulosemembran überführt. Hierbei wurden das Whatman-Papier (WP) und die Membran mit Transferpuffer befeuchtet und der wurde nach folgendem Schema aufgebaut: 3 Lagen WP, Membran, SDS-Gel, 3 Lagen WP. Die Kammer wurde geschlossen und der Blotvorgang mit 45 mA pro Gel für 1,5 h durchgeführt. Zur Kontrolle des Transfers wurde optional eine reversible Ponceau S Färbung durchgeführt. Hierzu wurde die Membran mit Ponceau S Lösung für ca. 1 min bedeckt und anschließend mit Wasser gewaschen. Proteinbanden wurden durch eine intensive Rotfärbung sichtbar. Zum Entfärben wurde die Membran mehrmals mit PBS gespült.

Zur Detektion spezifischer Proteine wurde eine Western Blot Analyse mit Hilfe von spezifischen Antikörpern durchgeführt. Hierzu wurde die Membran in Blockierungspuffer für 1 h blockiert und anschließend über Nacht mit der entsprechenden Antikörperverdünnung bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran mehrmals mit Waschpuffer gewaschen, bevor die Inkubation mit der entsprechenden sekundären Antikörperverdünnung für 2 h bei Raumtemperatur erfolgte. Nach gründlichem Waschen der Membran mit Waschpuffer (4 x 10 min) konnte diese mit Detektionslösung (ECL) versetzt werden und durch Auflegen eines Röntgenfilms wurden spezifische Proteinbanden sichtbar gemacht. Zum Entwickeln der Filme diente die Filmentwicklermaschine von Kodak.

### 2.2.3.3 Immunfluoreszenz

Eine Immunfluoreszenz wurde durchgeführt, um die intrazelluläre Lokalisation bestimmter Proteine zu analysieren. Hierzu wurden sterile Ø15 mm Glasplättchen in 12-Loch-Platten ausgelegt und diese bei 37°C für ca. 30 min mit einer 0,4 % Gelatinelösung inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Dieser Schritt war nötig, um eine gute Anheftung der Zellen zu gewährleisten. Pro Kavität einer 12-Loch-Platte wurden  $1,5 \times 10^5$  Zellen am Tag zuvor ausgelegt. Am nächsten Tag erfolgte die Infektion der Zellen mit einer MOI von 3 TCID<sub>50</sub>/Zelle. Fixiert wurden die Zellen 24 h nach Infektion mit 1 ml einer 4 % PFA-Lösung (20 min, 4°C) und anschließend wurden diese mehrmals mit je 1 ml PBS gewaschen. Danach erfolgte eine Inkubation der fixierten Zellen mit 1 ml 50 mM Ammoniumchlorid für 10 min und ein Waschschrift mit PBS. Zur Permeabilisierung der Zellen wurden diese 10 min mit 1 ml 0,3 % Permeabilisierungspuffer inkubiert und anschließend wieder mit PBS gewaschen. Um eine unspezifische Bindung des Primärantikörpers zu verhindern folgte ein Blockierungsschritt mit 0,2 % Gelatine/PBS für mindestens 10 min.

Die Primärantikörperverdünnung wurde in der entsprechenden Verdünnung in Blockierungspuffer hergestellt. Sollte eine Doppelfärbung durchgeführt werden, und stammten beide Primärantikörper aus unterschiedlichen Spezies, konnte die Inkubation dieser Primärantikörper gleichzeitig erfolgen. Hierzu wurden die Glasplättchen mit den fixierten Zellen nach oben in eine Feuchtekammer überführt und mit je 90 µl der Primärantikörperlösung bedeckt und inkubiert (über Nacht bei 4°C). Am nächsten Tag wurden die Glasplättchen wieder in die 12 Loch-Platte überführt und mehrmals mit PBS gewaschen und anschließend erneut mit Blockierungspuffer inkubiert. Die Sekundärantikörperlösung wurde ebenfalls wieder in Blockierungspuffer hergestellt und nach dem Überführen der Glasplättchen in die Feuchtekammer vorsichtig auf die Zellen gegeben (100 µl/Plättchen). Die Inkubation erfolgte hierbei für 2 h bei RT im Dunkeln. Nach diesem Schritt wurden die Zellen wieder in die 12 Loch-Platte überführt und erneut mit PBS gewaschen gefolgt von der Zellkernfärbung mit DAPI (1:20000 in PBS). Die Zellen wurden 15 min mit 1 ml der DAPI-Verdünnung überschichtet und anschließend gründlich mit PBS gewaschen. Danach wurden die Glasplättchen vorsichtig mit einem Tropfen „Mounting medium“ auf einem Objektträger befestigt (Zellen nach unten). Nach dem Aushärten konnten die Präparate mikroskopisch analysiert werden.

### 2.2.3.4 TUNEL-Assay

Zur Analyse der Apoptoseinduktion in humanen Zellen wurde das „*In situ* Cell Death Detection Kit, TMR red“ verwendet, das die spezifische Anfärbung apoptotischer Zellen

erlaubt. In apoptotischen Zellen entstehen DNA-Doppelstrangbrüche mit freien 3'-OH Enden. Diese freien Enden werden durch die terminale Deoxy-Nukleotidyltransferase (TdT) sequenzunabhängig mit dem im Kit enthaltenen rot-fluoreszierenden Tetramethylrhodamin-Deoxy-Uridin-Triphosphat (TMR-dUTP) markiert. Anschließend kann mit einem Fluoreszenzmikroskop das Ausmaß der Apoptose bestimmt werden, das proportional zur Intensität der Rotfärbung ist.

Hierzu wurden am Tag zuvor  $1 \times 10^5$  RPE-1 Zellen pro 12-Lochplatte auf Glasplättchen ausgelegt (vgl. Abschnitt 2.2.3.3) und am nächsten Tag mit einer MOI von 5 TCID<sub>50</sub>/Zelle infiziert. Nach der gewünschten Infektionsdauer wurden die Zellen wie bei einer Immunfluoreszenz auf den Glasplättchen fixiert und für den TUNEL-Assay benutzt. Hierzu wurden die Zellen 2 min auf Eis mit Permeabilisierungspuffer inkubiert, danach gewaschen mit PBS und anschließend in eine Feuchtekammer überführt. 50 µl des TUNEL-Markierungsansatzes (nach Herstellerangaben gemischt) wurde auf die Zellen pipettiert und diese bei 37°C für 1 h inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS wurde die optionale DAPI-Färbung und das Fixieren des Präparates auf einem Objektträger wie in Abschnitt 2.2.3.3 beschrieben durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Isolierung von MCMV/h

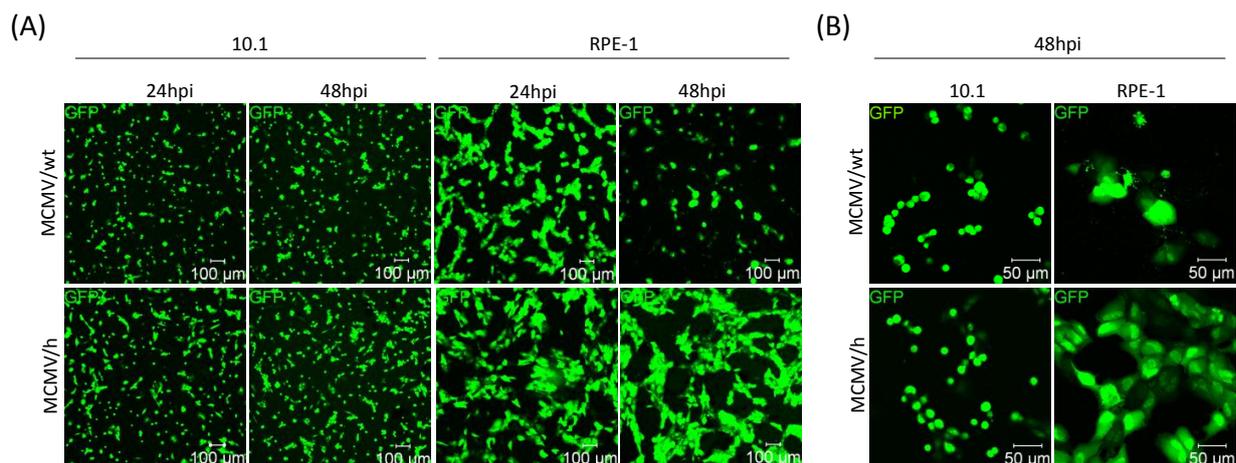
MCMV gehört zur Unterfamilie der  $\beta$ -Herpesviren, die als strikt speziesspezifisch angesehen werden. Es ist bekannt, dass Zytomegalieviren durchaus in der Lage sind, Zellen einer fremden Spezies zu infizieren. Dennoch findet eine permissive Infektion mit Ausbreitung nur in Zellen der eigenen oder nah verwandter Arten statt (Bruggeman et al. 1982, Kim und Carp 1972, Lafemina und Hayward 1988). Diese Restriktion der Infektion ist unter anderem dadurch begründet, dass in den infizierten Zellen die Infektion erkannt wird und diese Erkennung führt zur Induktion zellulärer Abwehrmechanismen wie z.B. der Apoptose. Wird die Induktion der Apoptose durch Überexpression antiapoptotischer Proteine im viralen oder zellulären Kontext blockiert, ist es möglich eine mehr oder weniger starke Infektion in speziessfremden Zellen zu etablieren (Jurak und Brune 2006).

Interessanterweise konnte beobachtet werden, dass das murine Zytomegalievirus doch in der Lage zu sein scheint, ohne die zusätzliche Expression fremder Gene in artfremden Zellen zu replizieren. In experimentellen Ansätzen, in denen humane RPE-1 Zellen mit MCMV/wt infiziert wurden, konnte beobachtet werden, dass es nach einiger Zeit hin und wieder zu einer massiven Zell-zu-Zell-Ausbreitung kam, obwohl eigentlich keine Ausbreitung erfolgen sollte (Igor Jurak, persönliche Mitteilung). Dieses Phänomen der spontanen Adaptation an die humanen Zellen konnte mehrmals beobachtet werden, war des Öfteren reproduzierbar und führte letztlich dazu, die Spezies-Spezifität in der Unterfamilie der  $\beta$ -Herpesviren zu hinterfragen.

Aus einem Infektionsexperiment mit spontan an humane RPE-1 Zellen adaptierten MCMV/wt, erkennbar am deutlichen und starken Wachstum, wurde mehrmals Überstand entnommen, Zelltrümmer pelletiert und zur Infektion neuer RPE-1 Zellen genutzt. Überraschenderweise führten solche Infektionen von Beginn an zu massiver Virusausbreitung und Plaquentstehung. Um auszuschließen, dass es sich hierbei um epigenetische Faktoren handelt, also um Veränderungen des Methylierungsmusters der viralen DNA, die in den humanen Zellen stattfindet und die Genexpression beeinflussen kann, wurde ein spontan adaptiertes Virus benutzt um murine 10.1 Zellen zu infizieren. Selbst nach mehrmaligen Reinfektionszyklen muriner 10.1 Zellen mit einem adaptierten Virus konnte immer wieder von Beginn an eine massive permissive Infektion in den humanen Zellen ausgelöst werden. Durch diese Passagierungsexperimente konnten epigenetische Faktoren somit ausgeschlossen werden, da die Eigenschaft zur Überwindung der Speziesbarriere auf Zellebene erhalten blieb.

Dies führte zur Vermutung, dass genetische Veränderungen innerhalb des Virusgenoms stattgefunden haben müssen.

Aus infizierten humanen Zellen mit spontaner Virusausbreitung wurde DNA isoliert und diese zur Rekonstitution von Virus in RPE-1 Zellen transfiziert. Nach einigen Tagen war erneut eine Zell-zu-Zell-Ausbreitung zu beobachten. Durch diesen Schritt konnte eine eventuell vorhandene Kontamination mit einem RNA-Virus ausgeschlossen werden, da die hierbei durchgeführte Phenol/Chloroform-Extraktion nicht geeignet ist, um RNA zu extrahieren. Virus aus dieser Transfektion wurde genutzt um einen hochtitrigen Virusstock für Experimente zu produzieren. Das so isolierte und spontan mutierte Virus, mit der Fähigkeit in humanen Zellen eine permissive lytische Infektion zu durchlaufen, wurde MCMV/h genannt. Dies soll ausdrücken, dass es sich hierbei um eine mutierte Form des MCMV/wt handelt, welches durch genetische Änderungen an humane Zellen adaptiert ist. Dieses exprimiert wie MCMV/wt ebenfalls GFP, liegt aber nicht als kloniertes BAC-Konstrukt vor.



**Abbildung 5: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach Infektion humaner RPE-1 und muriner 10.1 Zellen mit MCMV/wt und MCMV/h.** Die Zellen wurden auf Glasplättchen ausgesät, mit einer MOI von 5 TCID<sub>50</sub>/Zelle infiziert und zum angegebenen Zeitpunkt fixiert und analysiert. Die grüne Fluoreszenz zeigt infizierte Zellen an, da die verwendeten Viren GFP exprimieren. (A) Die ausgewählten Bereiche stellen Übersichtsaufnahmen infizierter Zellen dar. (B) Vergrößerte Ansicht infizierter Zellen. Deutlich zu erkennen sind die apoptotischen Vesikel in MCMV/wt infizierten humanen Zellen.

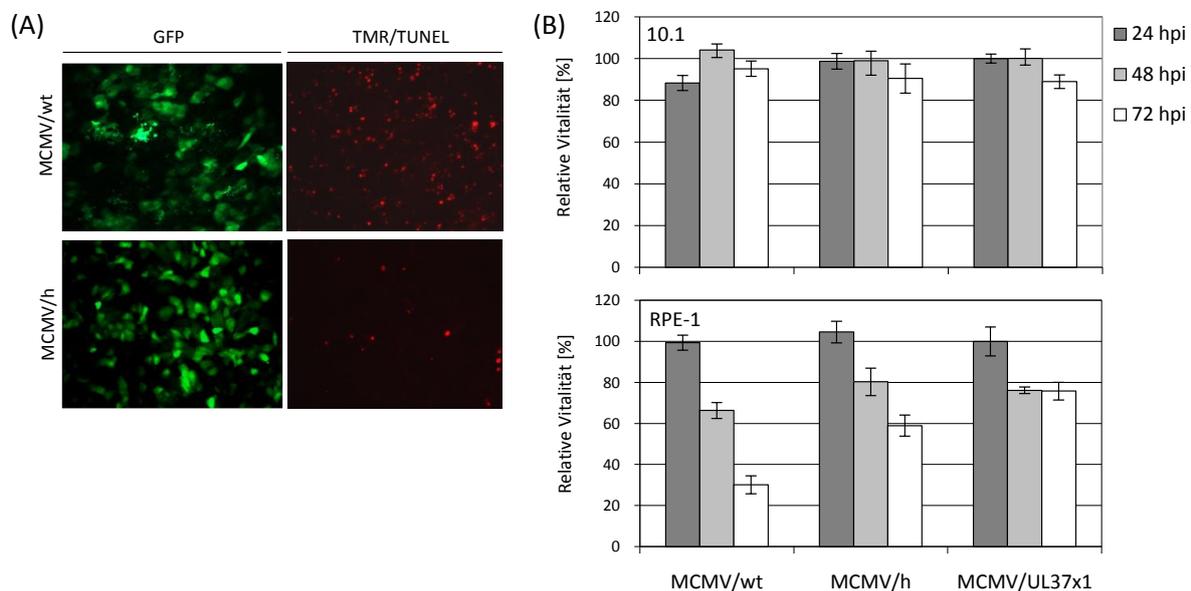
Infiziert man humane Zellen mit MCMV/wt wird hierdurch 48 - 72 h nach Infektion Apoptose ausgelöst und es kann somit keine Zell-zu-Zell Ausbreitung mehr stattfinden (Jurak und Brune 2006). Lichtmikroskopisch erkennt man, dass die Zellen sich ablösen und dass es zur Ausbildung apoptotischer Vesikel kommt. Durch diese apoptotischen Vorgänge kann eine virale Replikation nicht mehr gewährleistet werden. Initiale Beobachtungen im Fluoreszenzmikroskop ergaben, dass MCMV/h nach Infektion humaner Zellen jedoch scheinbar weniger stark Apoptose auslöst als MCMV/wt (Abbildung 5A und B). Selbst 48 h

nach Infektion mit MCMV/h sind mikroskopisch kaum apoptische Zellen zu erkennen, ganz im Gegenteil zu MCMV/wt infizierten Zellen. Grossaufnahmen Wildtyp-infizierter humaner Zellen zeigen deutlich, dass es zur Ausbildung der für die Apoptose typischen Vesikel nach 48 h kommt (Abbildung 5B). Nach einer Infektion muriner 10.1 Zellen mit MCMV/h oder MCMV/wt bleibt die Zahl der infizierten Zellen relativ konstant (Abbildung 5 A und B). Die Induktion der Apoptose scheint hier keine Rolle zu spielen bzw. kann durch die antiapoptischen Proteine in den spezieeigenen Zellen blockiert werden. Aufgrund dieser Beobachtungen, im Hinblick auf das unterschiedliche Verhalten in humanen Zellen, sollte das Virus MCMV/h einer näheren phänotypischen Charakterisierung unterzogen werden.

### 3.2 Phänotypische Charakterisierung von MCMV/h

#### 3.2.1 Untersuchungen zur Apoptoseinduktion

Wie bei der Isolierung des mutierten Virus beobachtet wurde, scheint eine Infektion mit MCMV/h weniger stark Apoptose in den speziesfremden humanen RPE-1 Zellen zu induzieren als eine Wildtypinfektion. Um diese Beobachtung zu bestätigen, wurde ein MTT-Vitalitätstest und ein Apoptose-spezifischer TUNEL-Assay durchgeführt.



**Abbildung 6: Untersuchungen zur Induktion der Apoptose nach Infektion humaner Zellen.** (A) TUNEL-Assay zur Bestimmung der Apoptoseinduktion in nicht-permissiven humanen RPE-1 Zellen. Diese wurden infiziert mit einer MOI von 5 TCID<sub>50</sub>/Zelle und nach 48 hpi fixiert, im TUNEL-Assay angefärbt und letztlich mikroskopiert. (B) MTT-Assay zur Messung der Zellvitalität nach Infektion. Hierfür wurden murine und humane Zellen mit einer MOI von 5 TCID<sub>50</sub>/Zelle infiziert, das Stoffwechselsubstrat MTT wurde nach den angegebenen Zeitpunkten hinzugegeben und der Farbumschlag letztlich photometrisch bestimmt. Zur Standardisierung wurde MCMV/UL37x1 verwendet, ein Virus, das das antiapoptische Gen UL73x1 von HCMV exprimiert.

Durch apoptotische Signale kommt es innerhalb des Zellkerns zur DNA-Fragmentierung und es entstehen freie 3'-OH-Enden, die im TUNEL-Assay mit fluoreszierenden Nukleotiden (TMR-dUTP) markiert werden. Diese DNA-Fragmentierung stellt ein relativ spätes Merkmal der Apoptose dar (Arends et al. 1990, Compton M. M. 1992). Die Anzahl der rot fluoreszierenden Zellkerne erlaubt somit eine Quantifizierung der apoptotischen Zellen. Wie in Abbildung 6A zu erkennen ist, induziert MCMV/h in humanen Zellen deutlich weniger Apoptose als MCMV/wt nach 48 hpi, sichtbar an dem verminderten bzw. vermehrtem Auftreten des roten Signales. Um zu testen, ob sich innerhalb dieser Zeit auch die Zellvitalität reduziert wurde ein MTT-Test durchgeführt. Hierbei spiegelt die Intensität der Blaufärbung durch Substratverwertung die Vitalität der infizierten Zelle wider. Dies ist möglich, da der Farbumschlag an die mitochondriale Aktivität lebender Zellen gekoppelt ist (Abbildung 6B).

Zur Festlegung einer Bezugsgröße in diesem Test wurde eine MCMV-Variante verwendet, die das antiapoptotische Protein UL37x1 von HCMV exprimiert. Dieses unterdrückt die mitochondrial-vermittelte Apoptose über Interaktion mit dem proapoptotischen Protein Bax. Infizierte humane Zellen sind nach Infektion mit dieser Mutante vor Apoptose geschützt und können deshalb als Bezugsgröße bzw. Standard verwendet werden (Goldmacher 2005, Goldmacher et al. 1999, Jurak und Brune 2006, Reboredo et al. 2004).

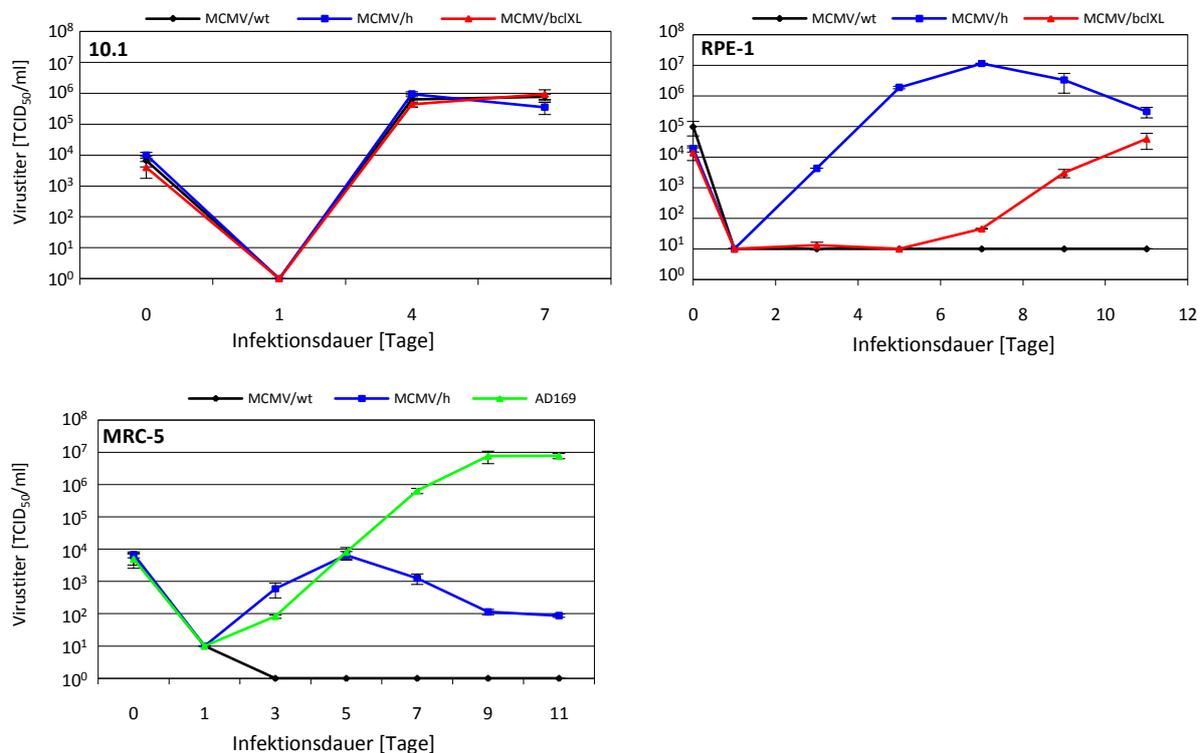
Wie zu erwarten war, zeigt sich kein Unterschied in der Vitalität muriner 10.1 Zellen nach Infektion mit MCMV/h oder MCMV/wt (Abbildung 6B). Die antiapoptotischen Proteine von MCMV vermitteln einen sehr guten Schutz gegenüber der Induktion der Apoptose als zellulären Abwehrmechanismus innerhalb der eigenen Spezies. Dagegen zeigt sich in infizierten humanen RPE-1-Zellen nach 72 h ein deutlicher Unterschied in Bezug auf Zellvitalität zwischen MCMV/h und MCMV/wt. Humane Zellen, die mit MCMV/wt infiziert wurden, zeigen im Gegensatz zu MCMV/h infizierten Zellen eine deutlich reduzierte Vitalität relativ zu MCMV/UL37x1 (Abbildung 6B). Bei Infektion mit MCMV/h zeigt sich zwar ebenfalls eine Abnahme der Vitalität, allerdings tritt dieser Effekt mit einer deutlich verzögerten Kinetik zu Tage. Da Viren zur Replikation auf vitale und funktionierende Zellen angewiesen sind, ist in der schwächeren Induktion der Apoptose durch MCMV/h ein deutlicher Replikationsvorteil gegenüber MCMV/wt zu sehen.

### **3.2.2 Analyse der Wachstumskinetiken in humanen Zellen**

Um das Wachstumsverhalten von MCMV/h in murinen und in humanen Zellen zu untersuchen, wurden Wachstumskurven angesetzt. Wiederum wurde hierbei als Kontrolle

eine Virusmutante verwendet, die ein antiapoptotisches Gen exprimiert. Hierbei handelt es sich um *bclX<sub>L</sub>*, dessen Genprodukt BclX<sub>L</sub> in die mitochondrial vermittelte Apoptose eingreift. Dieses versetzt die konstruierte Mutante MCMV/*bclX<sub>L</sub>* somit in die Lage, in humanen Zellen wachsen zu können (Jurak und Brune 2006).

Es zeigte sich, dass das Wachstum und die Replikation der getesteten Viren MCMV/wt, MCMV/h und MCMV/*bclX<sub>L</sub>* in murinen 10.1 Zellen mit der gleichen Effizienz und Kinetik stattfindet. Der höchste Titer wurde nach ca. 5 - 6 Tagen mit einem Wert von ca.  $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml erreicht (Abbildung 7). Dagegen unterscheiden sich die Viren in humanen Zellen deutlich voneinander. MCMV/wt ist im Gegensatz zu MCMV/h nicht in der Lage, in den humanen Epithelzellen (RPE-1) zu replizieren. MCMV/h erreicht in den humanen RPE-1 Zellen nach 7 Tagen mit einer Titer von ca.  $1 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>/ml den Titerhöchstwert und liegt somit sogar noch um den Faktor 10 höher, als bei Wachstum in den arteigenen murinen 10.1 Zellen (Abbildung 7). Das Kontrollvirus MCMV/*bclX<sub>L</sub>* ist zwar ebenfalls in der Lage in den RPE-1-Zellen zu wachsen, allerdings benötigt dieses hierfür mehr Zeit und erreicht selbst nach 11 Tagen nicht annähernd den höchsten Titer von MCMV/h (Abbildung 7).



**Abbildung 7: Wachstumsanalysen in murinen 10.1, humanen RPE-1 und primären humanen MRC-5 Zellen.** Hierzu wurden die Zellen jeweils in Triplikaten ausgesät und mit einer MOI von 0,2 TCID<sub>50</sub>/Zelle infiziert. Das Medium wurde zu den angegebenen Tagen ausgetauscht und der Virustiter im Überstand wurde durch Titration bestimmt.

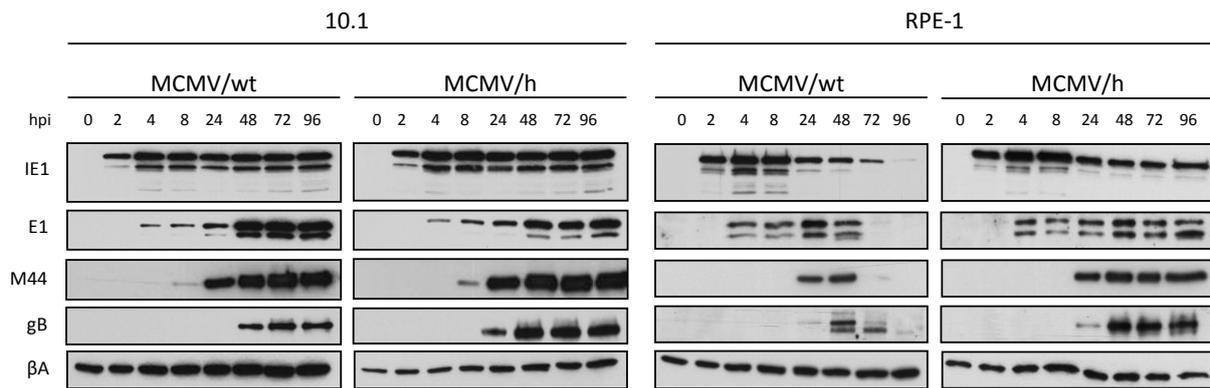
Um zu testen, ob es sich bei der Adaptation von MCMV/h nur um eine spezielle Anpassung an RPE-1 Zellen handelt oder ob MCMV/h ebenfalls in der Lage ist, in anderen humanen Zellen zu wachsen, wurde eine Wachstumsanalyse in humanen primären Lungenfibroblasten durchgeführt. In den ersten fünf Tagen nach Infektion zeigt MCMV/h hierbei ein Replikationsverhalten, das mit HCVM AD169 vergleichbar ist. Dann allerdings stoppt die Ausbreitung der Infektion und der Titer nimmt langsam aber stetig ab (Abbildung 7). MCMV/h scheint also auch in anderen humanen Zellarten wachsen zu können, allerdings mit einer eingeschränkten Effizienz. Wiederum zeigt sich, dass MCMV/wt nicht in der Lage ist, Virusnachkommen in den humanen MRC-5 Zellen zu bilden.

### 3.2.3 Genexpressionskinetik in speziesfremden Zellen

Um eine erfolgreiche permissive Infektion zu etablieren, muss eine vollständige Expression der viralen Gene gewährleistet sein. In Herpesviren werden Gene kaskadenartig exprimiert. Kurz nach Infektion findet die Expression der „immediate-early“ (IE) Gene statt, die als Aktivatoren der „early“ (E) Gene wirken. Diese sind wiederum notwendig zur Expression der „early-late“ (EL) Gene. Die „Late“ (L) Gene werden letztlich aktiviert, nachdem die Genomreplikation begonnen hat (Mocarski et al. 2007).

Bisher konnte gezeigt werden, dass MCMV/wt in humanen Zellen zwar in der Lage ist, Gene dieser verschiedenen Klassen zu exprimieren, allerdings mit geringerer Effizienz und mit zeitlicher Verzögerung. Die Expression des MCMV Glykoproteins B (gB), das für die Ausbreitung der Virusnachkommen essentiell ist, konnte in den humanen Zellen nicht detektiert werden (Jurak und Brune 2006). Da MCMV/h in der Lage ist, eine permissive Infektion in humanen Zellen zu etablieren, muss es folglich auch in der Lage sein, die für eine produktive Infektion nötigen Proteine zu exprimieren.

Um dies zu testen, wurde eine Proteinexpressionsanalyse in humanen RPE-1 Zellen und zum Vergleich in murinen 10.1 Zellen durchgeführt. Analysiert wurde die Expression des IE1 Proteins, der E1 Proteine, die Expression des M44 und des gB Proteins als jeweiliger Vertreter der IE, E, EL und L Genexpressionklasse. Wie in Abbildung 8 zu sehen ist, findet die Expression der getesteten Proteine nach Infektion mit MCMV/wt und MCMV/h in murinen 10.1 Zellen kaskadenartig statt. Diese erfolgt bei MCMV/h und MCMV/wt mit etwa der gleichen Stärke und Kinetik. Einzig die Expression des viralen gB Proteins scheint in den murinen Zellen nach Infektion mit MCMV/h beschleunigt zu sein und kann bereits 24 h nach Infektion detektiert werden (Abbildung 8).



**Abbildung 8: Proteinexpressionsanalyse in murinen 10.1 und humanen RPE-1 Zellen nach Infektion mit MCMV/wt bzw. MCMV/h.** Zellen wurden mit einer MOI von 5 TCID<sub>50</sub>/Zelle infiziert und nach den angegebenen Zeitpunkten [hpi, Stunden nach Infektion] lysiert. Das Zelllysate wurde für eine Western Blot Analyse benutzt. Mit spezifischen Antikörpern wurden ausgewählte Vertreter der jeweiligen Proteinkinetikklassen nachgewiesen (IE1, Immediate-early-1; E1, Early-1; M44, Untereinheit der DNA-Polymerase; gB, Glykoprotein B; βA, β-Aktin als Ladekontrolle)

Die Analyse der Expressionskinetik in den humanen nicht-permissiven Epithelzellen zeigt, dass MCMV/h in der Lage ist, die Expression der getesteten Proteine aus den verschiedenen Kinetikklassen, inklusive des spät exprimierten viralen Glycoprotein B, zu durchlaufen und über einen langen Zeitraum hinweg aufrecht zu erhalten (Abbildung 8). Diese Expression ist in der Stärke vergleichbar mit der in permissiven murinen 10.1 Zellen. MCMV/wt infizierte Zellen hingegen zeigen anfangs ebenfalls eine Expressionskinetik vergleichbar mit der in permissiven Zellen. Allerdings werden die Zellen ca. 48 - 72 h nach Infektion apoptotisch (vgl. Abschnitt 3.2.1) und eine vollständige und vor allem effiziente Genexpression kann nicht mehr aufrechterhalten werden. Stattdessen kommt es im Zuge der Apoptose zur Proteindegradation. 72 h nach Infektion können deshalb kaum mehr Proteinsignale detektiert werden (Abbildung 8). Die Expression des essentiellen gB Proteins nach Infektion mit MCMV/wt in den humanen Zellen ist zwar 48 h nach Infektion detektierbar, allerdings nur in degradierter Form, erkennbar an den mehreren Banden im Western Blot (Abbildung 8).

Da MCMV/h deutlich weniger Apoptose in den normalerweise nicht-permissiven RPE-1 Zellen induziert, ist dieses, wie mit dieser Expressionsanalyse gezeigt, deshalb auch in der Lage, die Proteine der verschiedenen Kinetikklassen und funktionelles gB zu exprimieren. Somit kann es auch Virusnachkommen bilden und in Folge dessen eine permissive Infektion etablieren.

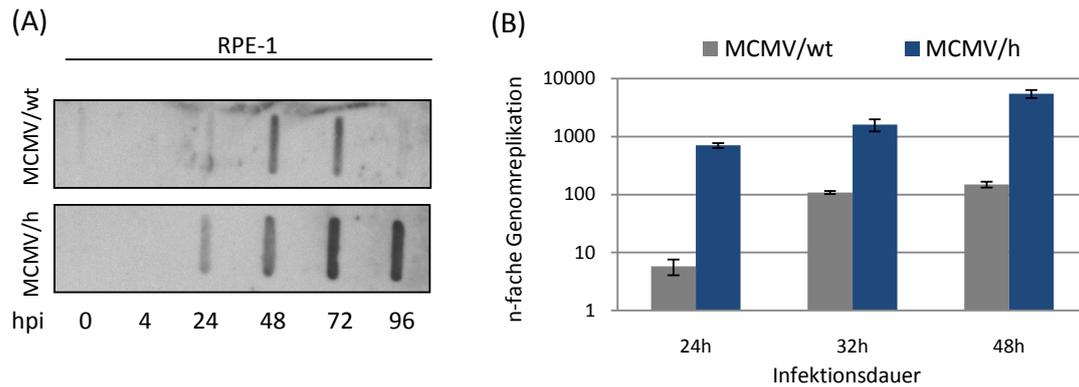
### 3.2.4 DNA-Replikation in humanen RPE-1 Zellen

Da bereits gezeigt werden konnte, dass MCMV/h in humanen Zellen repliziert, sollte die Kinetik und Effizienz der Genomreplikation mittels „Southern Slot Blot“ und Realtime-PCR-Analysen im direkten Vergleich zu MCMV/wt untersucht werden.

Für die „Southern Slot Blot“-Analyse wurde eine Sonde gegen das MCMV Gen M45 verwendet (Mack et al. 2008). Wie zu erwarten war, zeigt sich in den humanen Zellen ein deutlicher Unterschied in der Effizienz der DNA-Replikation zwischen MCMV/h und MCMV/wt. „Slot Blot“-Analysen in infizierten humanen Epithelzellen zeigen, in Analogie zu den bisherigen Ergebnissen, dass MCMV/h in der Lage ist, über den gesamten beobachteten Zeitraum von 96 h, virale Genomkopien herzustellen. Beginnend ab 24 h nach Infektion [hpi] steigt die virale DNA Menge über den beobachteten Zeitraum deutlich an (Abbildung 9A). MCMV/wt infizierte Zellen hingegen zeigen zwar ebenfalls eine schwache Replikation viraler DNA zu Beginn der Infektion, allerdings kommt diese letztlich nach ca. 48 - 72 h zum Erliegen, bis nach 96 h kaum mehr ein Signal zu detektieren ist (Abbildung 9). Diese Beobachtung kann wieder auf die Induktion der Apoptose zurückgeführt werden (vgl. Abschnitt 3.2.1).

RealTime-PCR-Analysen zur Bestimmung der Genomkopienzahl in humanen RPE-1 Zellen bestätigten das Ergebnis des Slot Blots. In der frühen Phase der Replikation zeigt sich, dass MCMV/wt in der Lage ist, eine Genomreplikation durchzuführen, allerdings mit einer deutlichen Zeitverzögerung im Vergleich zu MCMV/h und mit einer geringeren Effizienz (Abbildung 9B). Nach Infektion mit MCMV/h zeigt sich bereits nach 24 h eine sehr deutliche und starke Zunahme der Genomkopienzahl, deren Anzahl im Verlauf der Infektion bis zu 48 h noch deutlich gesteigert wird. Eine stärkere Zunahme der Genomkopien lässt sich bei einer MCMV/wt Infektion erst nach 32 h feststellen und im weiteren Verlauf der Infektion nimmt diese Kopienzahl nur noch leicht zu (Abbildung 9B).

In der frühen Phase der Infektion ist MCMV/h in den speziessfremden humanen Zellen also in der Lage, deutlich früher und effizienter eine Genomreplikation durchzuführen als dies bei MCMV/wt der Fall ist.



**Abbildung 9: Analyse der viralen Genomreplikation in humanen RPE-1 Zellen.** (A) „Southern Slot Blot“-Analyse zur Replikationsfähigkeit in humanen RPE-1 Zellen. Diese wurden mit einer MOI von 5 TCID<sub>50</sub>/Zelle infiziert und gesamt-genomische DNA wurde aus den infizierten Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten isoliert. Zur Analyse im Slot Blot wurden je 1 µg DNA eingesetzt. Als Sonde wurde hierbei ein Teilfragment von MCMV M45 verwendet. (B) RealTime-PCR-Analyse zur Bestimmung der Genomreplikationseffizienz nach Infektion der Zellen mit einer MOI von 0,5 TCID<sub>50</sub>/Zelle und gesamt-genomischer DNA-Isolierung. Hierbei wurde die n-fache Genomvervielfältigung bestimmt, indem die Inputvirusmenge zum Zeitpunkt t= 8 hpi auf 1 gesetzt wurde, da dieser Wert die tatsächlich in der Zelle befindliche Virusmenge widerspiegelt.

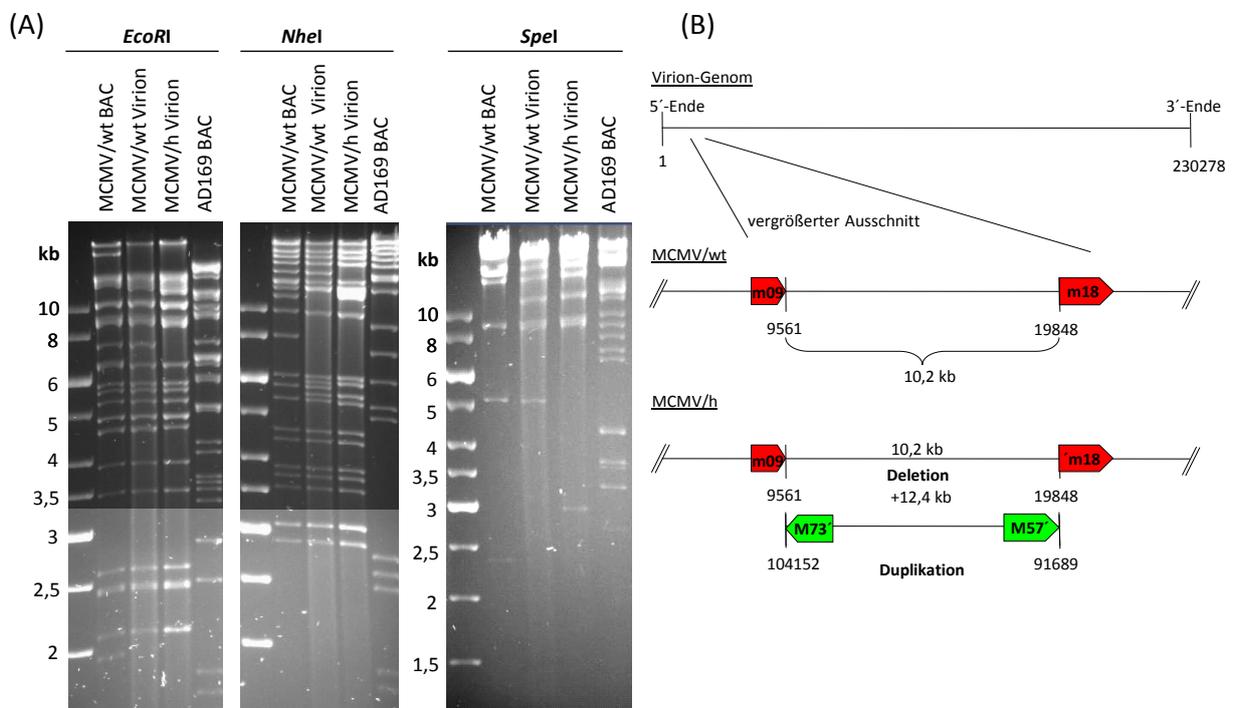
Auch bei diesen Untersuchungen zur Genomreplikation spiegelt sich deutlich der Einfluss der induzierten Apoptose wider. Die Genomreplikation von MCMV/wt nach Infektion humaner Zellen wird hierdurch weniger effizient und zu späten Zeitpunkten nicht mehr ermöglicht (Abbildung 9A). Da MCMV/h deutlich weniger Apoptose auslöst, besteht hier wieder ein klarer Vorteil, da die virale Genomreplikation stärker und vor allem über einen längeren Zeitraum stattfinden kann.

Nach dieser phänotypischen Charakterisierung, stellte sich natürlich die Frage, welche Gene oder Genbereiche von MCMV/h mutiert sind und wie diese bei der Überwindung der Speziesbarriere *in vitro* von Nutzen sein können. Um diese Fragen zu beantworten, wurde eine MCMV/h-Genomanalyse mit isolierter Virion-DNA durchgeführt.

### 3.3 Genomanalyse von MCMV/h

#### 3.3.1 Virion-DNA-Verdau

Das MCMV-Genom ist circa 230 kb gross. Zur einfachsten Analyse eines solch großen viralen Genoms zählt der Restriktionsverdau mit verschiedenen Enzymen und anschließender elektrophoretischer Auftrennung der entstandenen Fragmente. Hierbei lassen sich allerdings keine Punktmutationen detektieren, es sei denn, eine Restriktionsschnittstelle ist durch die Mutation betroffen. Dieser Ansatz dient also lediglich der Detektion von größeren Deletionen, Duplikationen oder genetischen Rearrangements. Da MCMV/h nur als Virion-DNA verfügbar ist und nicht als kloniertes BAC-Konstrukt vorliegt, wurde als Vergleich ebenfalls MCMV/wt-Virion-DNA verwendet. Virion-DNA enthält allerdings keine BAC-Kassette mehr (Wagner et al. 1999) und liegt im Gegensatz zu BAC-DNA nicht zirkulär vor, wodurch wiederum Änderungen im Bandenmuster entstehen. Deshalb wurde als Kontrolle ebenfalls MCMV/wt-BAC-DNA verwendet, um diese Unterschiede von eventuell echten Bandenveränderungen unterscheiden zu können. Als weitere Kontrolle wurde HCMV AD169 BAC-DNA verwendet, um zu zeigen, dass MCMV/h tatsächlich von MCMV/wt abstammt und keine Kontamination mit HCMV darstellt.

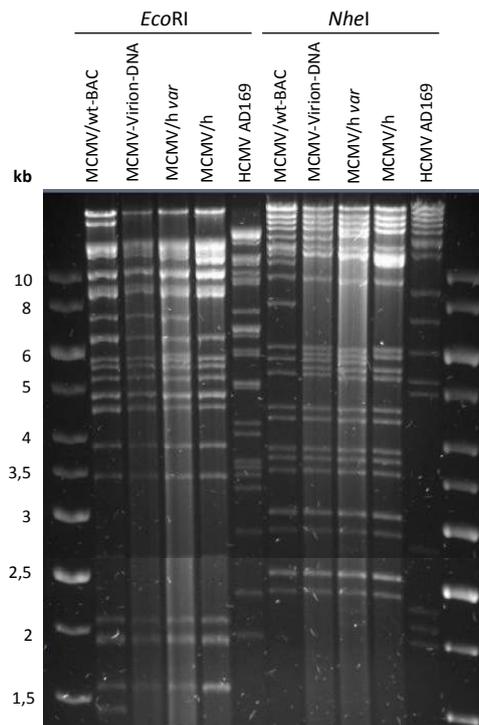


**Abbildung 10: Genomanalyse mittels Virion-DNA-Restriktion.** (A) 1,5 µg Virion- bzw. BAC-DNA wurde mit dem entsprechenden Enzym verdaut und die Fragmente wurden anschließend mittels Elektrophorese aufgetrennt und analysiert. Um zu zeigen, dass es sich bei MCMV/h tatsächlich um einen Variante von MCMV/wt handelt, wurde ebenfalls HCMV AD169 BAC-DNA als Kontrolle verwendet. (B) Schematische Skizze zur Verdeutlichung des genetischen Rearrangements in MCMV/h.

Tatsächlich konnte mit diesem Ansatz eine große genetische Veränderung im Genbereich m10 - m18 detektiert werden (Abbildung 10). Wie im Restriktionsverdau der MCMV/h-Virion-DNA zu sehen ist, stimmt das Muster zu großen Teilen mit dem von MCMV/wt-Virion-DNA überein und zeigt keinerlei Ähnlichkeit zum Bandenmuster eines AD169 HCMV-BAC-Verdaus (Abbildung 10A). Es lassen sich jedoch wenige, aber dafür eindeutige Unterschiede in den drei durchgeführten Restriktionsansätzen ausmachen. Im *EcoRI*-Verdau zeigt sich in MCMV/wt eine Bande bei 7,2 kb, die nicht im Muster von MCMV/h zu finden ist. Dagegen findet man dort eine zusätzliche Bande bei ca. 12 kb und eine weitere verschwindet bei 4,4 kb. Auch im *NheI* Verdau lassen sich Unterschiede finden. So verschwinden in MCMV/h Banden bei 5,6 und 15,4 kb und es entstehen zusätzliche Banden bei ca. 11 kb. Im *SpeI* Verdau sieht man eine deutliche Verkleinerung der ca. 5 kb großen Bande in MCMV/wt zu einer ca. 3 kb großen Bande in MCMV/h (Abbildung 10A).

Mit Hilfe von Computerprogrammen (Clone Manager, Sci-Ed Software) lässt sich vorhersagen, welche DNA-Fragmente nach welchem Verdau entstehen. So war es möglich den Bereich, in dem diese Veränderungen stattgefunden haben, einzugrenzen. Dieser wurde mit Hilfe von geeigneten Oligonukleotiden vom 5'- bzw. 3'-Ende zur Analyse sequenziert. Durch diese Analysen zeigte sich, dass der Genbereich zwischen m10 und m18 (pos. 9561 - 19848) in MCMV/h komplett deletiert ist. Allerdings hat eine inverse Duplikation des DNA-Bereiches M57 - M73 (pos. 91689 - 104152) in genau diesem deletierten Bereich stattgefunden. Weil hierdurch natürlich auch Restriktionsschnittstellen deletiert bzw. dupliziert wurden, lassen sich die Veränderungen im Bandenmuster somit genau erklären. Das Virion-Genom vergrößert sich durch diese beiden genetischen Rearrangements um circa 2,2 kb (Abbildung 10B). Diese Vergrößerung scheint allerdings keine Probleme bei der Verpackung der DNA ins Kapsid zu bereiten. Wäre dies der Fall, dann könnten keine neuen Viruspartikel freigesetzt werden. Es stellte sich also nun die Frage, ob die Deletion bzw. die Duplikation und damit eine mögliche Gendosiserhöhung für eine permissive Infektion in humanen Zellen von Nöten ist.

Wie bereits beschrieben, lässt sich eine Adaptation von MCMV/wt an humane Zellen wiederholen (vgl. Abschnitt 3.1). Von solch einem weiteren adaptierten Virus mit dem Namen MCMV/h.*var(iante)*, das eine ähnliche phänotypische Ausprägung aufwies, wurde ebenfalls Virion-DNA isoliert und mittels Restriktionsverdau analysiert (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Genomanalyse von MCMV/h.var nach Isolierung von Virion-DNA und Restriktionsverdau.** Je 1,5 µg DNA wurden mit *EcoRI* bzw. *NheI* verdaut und die entstandenen Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert.

Wie sich in dieser Restriktionsanalyse zeigt, hat dieses alternativ adaptierte Virus MCMV/h.var kein erkennbares genetisches Rearrangements im Sinne einer Duplikation oder Deletion im Bereich m10 - m18, so wie dies bei MCMV/h zu finden war. Dies legt den Schluss nahe, dass die Duplikation des detektierten Bereichs für eine permissive Infektion nicht notwendig zu sein scheint. Aus technischen Gründen kann dies allerdings nicht klar gezeigt werden, da die Duplikation nicht ohne Probleme im Zuge einer BAC-Mutagenese in MCMV/wt eingebaut werden kann. Zum einen müsste hier ein Fragment mit einer Größe von über 12 kb mit den entsprechenden Homologiebereichen und ohne zusätzliche Mutation generiert werden und zum Anderen läge eine sehr große Homologie von circa 12 kb mit dem *in situ* Bereich dieses Abschnittes vor. Dies würde dazu führen, dass dort bevorzugt eine Rekombination stattfindet, weshalb der Einbau der Duplikation an anderer Stelle enorm erschwert wäre.

Interessanterweise zeigte sich bei MCMV/h.var eine Verschiebung einer 4,4 kb Bande zu einer ca. 6 kb großen Bande (Abbildung 11). Bei dieser Bande (pos. 10473 - 14964) handelt es sich tatsächlich um einen Teilbereich der m10 - m18 Region, die in MCMV/h deletiert ist. Diese neue Bande muss folglich durch Insertion einer DNA-Sequenz unbekannter Herkunft erfolgt sein, und könnte unter Umständen zu einer Unterbrechung des Leserahmens eines

bestimmten Genes führen, das ebenfalls in MCMV/h deletiert ist und einen Einfluss auf das Wachstum in humanen Zellen hat.

Um diese Hypothese zu testen, wurde die Extrabande aus einem präparativen BAC-Gel isoliert, in den Vektor pcDNA3 kloniert und sequenziert. Sequenzanalysen dieses Konstruktes zeigten, dass tatsächlich eine Insertion an der Nukleotidposition 14210 stattgefunden hat, die das Gen m15 (pos. 14085 - 150629) unterbricht. Durch diese Unterbrechung kann somit eine sinnvolle Expression nicht mehr gewährleistet sein. Bei der inserierten Sequenz handelt es sich allerdings nicht um eine Duplikation eines viralen Abschnitts, sondern um eine bakterielle DH10B Sequenz, die durch fehlerhafte Replikationsvorgänge innerhalb der Bakterienzelle entstanden sein muss, und braucht daher nicht berücksichtigt zu werden. Wie sich später noch zeigen wird, übt die Unterbrechung bzw. die Deletion des m15 Gens keinen Einfluss auf das Wachstum in humanen Zellen aus (Abschnitt 3.4.4).

Die hier durchgeführten Genomanalysen mittels Restriktionsverdau belegen, dass genetische Rearrangements in MCMV/h stattgefunden haben, wobei der Einfluss der Duplikation wahrscheinlich vernachlässigt werden kann. Untersuchungen zum Einfluss des deletierten Bereiches m10 - m18 wurden durchgeführt und sind in Abschnitt 3.4.4 näher erläutert.

### **3.3.2 Genomsequenzierung und Analyse**

Da es sich bei der Adaptation von MCMV/wt an die humanen RPE-1 Zellen und im geringeren Umfang auch an die MRC-5 Zellen um genetische Veränderungen handeln muss, wurde das komplette Genom sequenziert und analysiert. Diese Sequenzierung lieferte einen sehr großen Teil des viralen Genoms, allerdings mit einigen Lücken. Deshalb war es nötig, die wichtigen fehlenden Teilbereiche mit neu konstruierten Oligonukleotiden zu resequenzieren. Die erhaltenen Daten wurden mit der in der Datenbank veröffentlichten Sequenz des MCMV-Genoms, Stamm Smith (NC\_004065, (Rawlinson et al. 1996)), verglichen. Gefundene Abweichungen in der MCMV/h-Virion-DNA zur publizierten Sequenz wurden resequenziert, um Sequenzartefakte ausschließen zu können. Wurde eine echte Abweichung zur Datenbanksequenz gefunden, wurde zusätzlich MCMV/wt-BAC-DNA sequenziert um zu klären, ob diese Abweichung schon in diesem parentalen Ausgangskonstrukt zu finden war und somit zu vernachlässigen ist. Durch diese Vorgehensweise konnten eine Reihe von Mutationen bzw. Sequenzabweichungen zur publizierten Sequenz detektiert werden (Tabelle 3).

Für eine nähere Analyse, in Bezug auf einen möglichen Einfluss bei Infektionen in speziessfremden Zellen, wurden nur Mutationen bzw. Sequenzabweichungen untersucht, die mit Sicherheit in MCMV/h zu finden waren, aber nicht in MCMV/wt. Bei den gefunden

Abweichungen in MCMV/wt kann es sich tatsächlich um erworbene Mutationen handeln oder aber um Fehler oder Artefakte in der veröffentlichten Sequenz. Letztlich spielt dies nur eine untergeordnete Rolle, da die Mutationen in MCMV/wt auch in MCMV/h zu finden waren, da dieses auf Basis des Wildtyps entstanden ist. Diese Sequenzunterschiede wurden daher für die weiteren Analysen nicht berücksichtigt. Eine Zusammenfassung der gefundenen Mutationen und Sequenzunterschiede zur publizierten Sequenz ist in Tabelle 3 zu finden.

**Tabelle 3: Zusammenstellung der gefundenen Mutationen und Sequenzunterschiede in MCMV/h zu der veröffentlichten Sequenz MCMV/wt Stamm Smith (Rawlinson et al. 1996)** Analysiert wurde der Genombereich ausgehend von m01 - m149, wobei in einigen wenigen Teilbereichen noch kleinere Sequenzlücken vorliegen.

Gen/ORF	Position	Sequenzunterschiede	Änderung in der vorhergesagten Aminosäuresequenz	im Wt-BAC vorhanden
m10 - m18	9561-19848	$\Delta$ 10288	$\Delta$ m10 - m18	nein
	104152-91689	Inverse Duplikation	Duplikation von M57 - M73	nein
m20	20958	$\Delta$ G	Verlängerter ORF	ja <sup>a</sup>
M26 - M27	31973	+G	intergenische Region	ja
m29	36197	+G	Verschiebung + verkürzter ORF	ja <sup>b</sup>
m29.1	36197	+G	Verschiebung + verlängerter ORF	ja <sup>b</sup>
m30	37263	+C	Verschiebung + verlängerter ORF	ja <sup>b</sup>
M31	38803	+G	Verschiebung + verlängerter ORF	ja <sup>a</sup>
M32	40000	C→T	-	ja
M45	61917	+C	Fusion der ORFs M45/m45.1	ja <sup>c</sup>
m58	92088	$\Delta$ A	Verschiebung des mittleren ORF aber trotzdem gleiches Stopcodon	ja
	92178	C→G		ja
	92179	+CG		ja
	92206	CG→GC		ja
	92226	G→A		ja
	92230	G→A		ja
	92358	$\Delta$ G		ja
M71 - M72	102942	$\Delta$ A	intergenische Region	ja
M78 - M79	112624	+T	intergenische Region	ja
M86	123941	A→C	Asn <sub>1104</sub> →His <sub>1104</sub>	ja
	123951	T→G	Leu <sub>1107</sub> →Arg <sub>1107</sub>	ja
M93	135803	A→C	-	ja
M102	146853	G→A	Asp <sub>420</sub> →Asn <sub>420</sub>	ja
m108	162352-162389	$\Delta$ 37nt	Deletion einer miRNA <sup>d</sup> (pos. 162364 – 162385)	nein
	162374	A→G	-	ja <sup>d</sup>
	162380	A→G	-	ja <sup>d</sup>
M112	163118-163126	$\Delta$ 9 nt	$\Delta$ GSP at pos. 8-10	nein
	163813	C→T	-	nein
	164243	A→G	Thr <sub>352</sub> →Ala <sub>352</sub>	nein
	164442	G→A	Gly <sub>418</sub> →Glu <sub>418</sub>	nein
M116	168256	G→A	Gly <sub>206</sub> →Val <sub>206</sub>	nein
	168370	G→A	Ala <sub>256</sub> →Val <sub>256</sub>	nein
	168376	G→A	Ser <sub>258</sub> →Phe <sub>258</sub>	nein
	168526	C→A	Thr <sub>296</sub> →Iso <sub>296</sub>	nein
m119.1	172403	C→A	Gly <sub>197</sub> →Trp <sub>197</sub>	nein
M122 Ex5	179136	G→A	Ser <sub>227</sub> →Phe <sub>227</sub>	ja
m129	187786	$\Delta$ T	Verschiebung ORF + Stopcodon	ja
m143	201402	+G	Verschiebung + verlängerter ORF	ja <sup>e</sup>

<sup>a</sup> (Kattenhorn et al. 2004)

<sup>b</sup> (Ahasan und Sweet 2007)

<sup>c</sup> (Brune et al. 2001)

<sup>d</sup> (Buck et al. 2007, Dölken et al. 2007)

<sup>e</sup> (Child et al. 2006, Valchanova et al. 2006)

Wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben, wurde eine große Deletion von ca. 10,2 kb in MCMV/h durch Restriktionsanalyse gefunden. Tatsächlich konnte die Firma Makrogen, die mit der Genomsequenzierung beauftragt war, ebenfalls keine Informationen zu diesem viralen Genomabschnitt generieren, wodurch die Beobachtung der Deletion nochmals bestätigt wurde. Funktionelle Genomabschnitte innerhalb der duplizierten Sequenz finden sich für die HCMV homologe UL69, UL70 und UL72 also die ORF M69, M70 und M72. Diese codieren für einen Transaktivator (UL69) (Winkler et al. 1994), einen Teil des Primase-Helikase-Komplexes (UL70) (Dallas et al. 1994) und für eine dUTPase (UL72) (Pyles et al. 1992). Zusätzlich befindet sich in diesem duplizierten Genombereich auch der Replikationsursprung ( $ori_{Lyt}$ ), von dem ausgehend während lytischer Infektionen neue Genomkopien gebildet werden (Rawlinson et al. 1996).

Die im Bereich m108 gefundene Deletion von 37 Nukleotiden bewirkt die Deletion einer viral codierten miRNA, deren Funktion bisher nicht bekannt ist (Buck et al. 2007, Dölken et al. 2007). miRNAs sind kurze, konservierte und nicht-codierende RNAs, die eine wichtige Funktion in der Genregulation leisten

Die Proteine der Genregion M112/113 sind homolog zu UL112/113 in HCMV und deshalb ähnlich in Bezug auf Genexpression und Genorganisation. Durch alternative Spleißvorgänge werden verschiedene 112/113 Proteinisoformen exprimiert. Diese sind bei HCMV 34, 43, 50 und 84 kDa groß (Wright und Spector 1989) und bei MCMV 33, 36, 38 und 87 kDa groß (Ciocco-Schmitt et al. 2002). Die verschiedenen Isoformen werden mit einer E-Kinetik exprimiert und es konnte gezeigt werden, dass diese Proteine maßgeblich am Aufbau der Replikationskompartimente beteiligt sind und für eine effiziente DNA-Replikation benötigt werden (Ahn et al. 1999, Yamamoto et al. 1998).

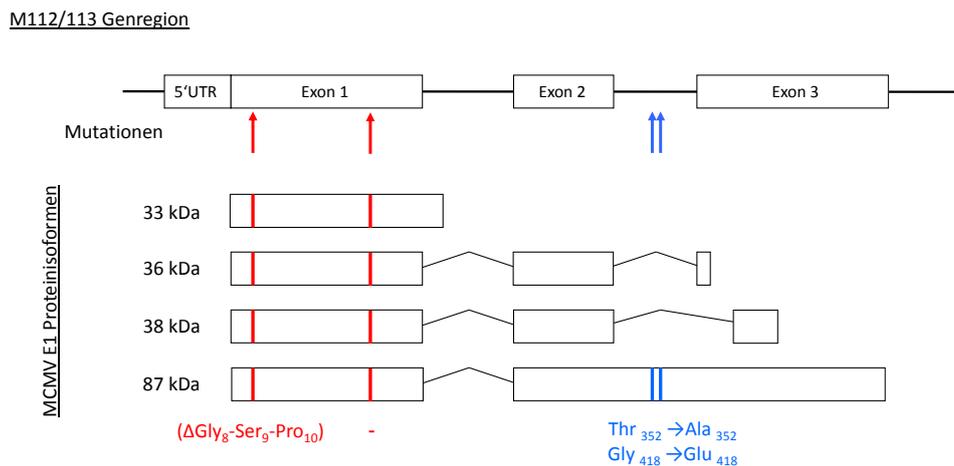
### **3.4 Einbau der gefundenen Mutationen mittels BAC-Mutagenese in MCMV/wt**

Die Mutationen, die nur in MCMV/h zu finden waren, wurden mit Hilfe der BAC-Technologie in den MCMV/wt-BAC eingebaut. Aus diesen BAC-Konstrukten wurden Virusmutanten rekonstituiert und diese wurden letztlich für Testinfektionen verwendet. Hiermit sollte ein möglicher Einfluss auf das Wachstum in nicht-permissiven humanen RPE-1 Zellen analysiert werden.

#### **3.4.1 Untersuchungen zum Einfluss der Mutationen in M112**

Wie in Tabelle 3 dargestellt, konnten mehrere Mutationen im Genbereich M112/113 (E1 Proteine) gefunden werden, die nicht in MCMV/wt zu finden waren. Bekanntermaßen werden von dieser Genregion die verschiedenen Isoformen der E1 Proteine durch alternatives

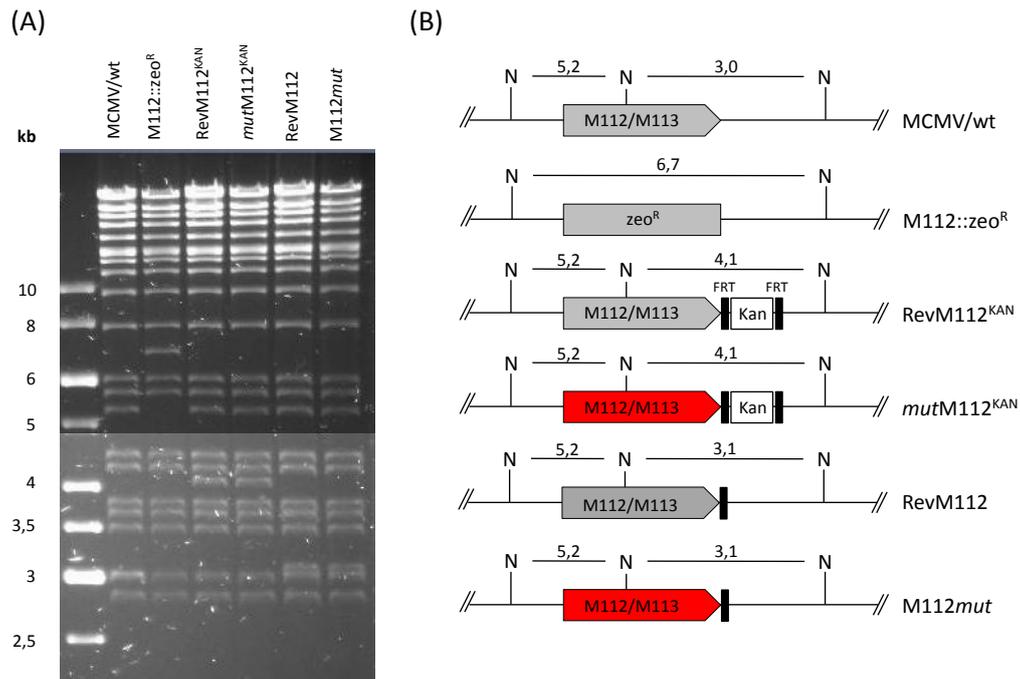
Spleißen der mRNA synthetisiert (Bühler et al. 1990, Ciocco-Schmitt et al. 2002). Durch Interaktion, der verschiedenen Isoformen miteinander und mit anderen Proteinen, werden die Replikationskompartimente gebildet, in denen virale DNA-Replikation stattfindet. Da sich die gefundenen Mutationen in unterschiedlichen Bereichen der kodierenden Sequenz von M112/113 befinden, sind nicht alle E1 Isoformen gleichmäßig von den Mutationen betroffen (Abbildung 12).



**Abbildung 12: Schematische Übersicht der gefundenen Mutationen im Genbereich M112/113 und deren Auswirkungen auf die verschiedenen Isoformen der M112/113 Proteine (Ciocco-Schmitt et al. 2002).** Dargestellt ist die Exon/Intron-Struktur dieser Genregion und die daraus durch alternatives Spleißen entstehenden M112/113 Proteinisoformen. Rote Striche markieren die gefundenen Sequenzabweichungen, die alle Isoformen betreffen. Die daraus resultierenden Aminosäureänderungen sind jeweils angegeben. Die blauen Striche geben die Abweichungen an, die nur in der großen Isoform zu finden sind. Das größte aller E1 Proteine hat eine vorhergesagte Masse von 66 kDa. Tatsächlich befindet sich diese Proteinisoform in Western Blot-Analysen aber bei 87 kDa. Diese Erhöhung der Masse ist wohl auf posttranslationale Modifikationen zurückzuführen (Ciocco-Schmitt et al. 2002).

Da das erste Exon der kodierenden Sequenz Teil aller E1 Isoformen ist, finden sich die detektierten Mutationen, die zur Deletion des Aminosäuremotives Gly-Ser-Pro an den Positionen 8-10 ( $\Delta$ GSP) führen, auch in allen Isoformen wieder (Abbildung 12). Die zweite Mutation in Exon 1 dagegen ist still. Die beiden letzten Nukleotidaustausche sind nur im Intron 2 lokalisiert, das Teil der 87 kDa Isoform ist, und somit für diese Form eine wichtige kodierende Sequenz darstellt. Somit sind die gefundenen Aminosäureaustausche Thr<sub>352</sub>→Ala<sub>352</sub> und Gly<sub>418</sub>→Glu<sub>418</sub> auch nur in der großen Isoform zu finden (Abbildung 12). Um den Einfluss dieser Mutationen zu testen wurde eine BAC-Mutagenese auf Basis des MCMV/wt-BACs durchgeführt. Hierzu wurde der gesamte Genbereich von M112/113 (pos. 163097-165079) aus MCMV/wt bzw. MCMV/h kloniert und sequenziert, um PCR-Artefakte auszuschließen. Anschließend wurde über eine *Mfe*I-Schnittstelle die Kanamycin-FRT-Kassette kloniert. Aus diesem Konstrukt konnte das zur Rekombination benötigte

Homologiefragment über *NotI* und *PstI* isoliert werden (vgl. Abschnitt 2.2.2.14.1). Nach erfolgreicher Rekombination wurde die inserierte Kanamycinkassette mit Hilfe einer FLP-Rekombinase entfernt, wobei nur eine der beiden FRT-Sequenzen im Genom zurückblieb. Kontrollverdau der einzelnen Zwischenkonstrukte und der finalen BAC-Mutanten zeigten jeweils die vorhergesagten Bandenänderungen, wodurch die Richtigkeit der Konstrukte bestätigt werden konnte (Abbildung 13).

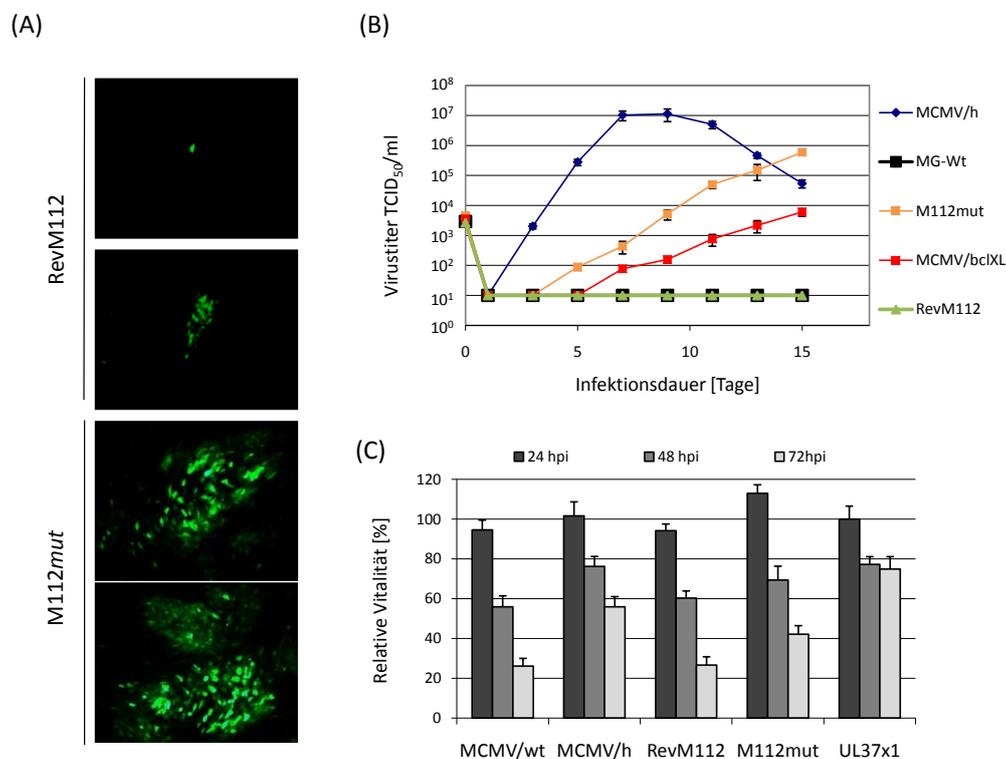


**Abbildung 13: Restriktionsanalyse und Schema der konstruierten M112/113-BAC Mutanten.** (A) Je 1,5 µg der isolierten BAC-DNA wurden mit *NheI* verdaut und die Fragmente anschließend elektrophoretisch getrennt. Fragmente, die kleiner als 2,5 kb sind wurden hier nicht berücksichtigt, da keine Änderungen zu erwarten war. (B) Schematische Darstellung der BAC-Konstrukte innerhalb der modifizierten Genregion M112/113 mit Angabe der jeweils zu erwartenden Banden nach einem *NheI* Verdau. (Schnittstellen von *NheI* sind durch N markiert). (Rev, Revertante; *Kan*, Kanamycinkassette mit FRT-Stellen; *mut*; mutierte Sequenz)

Aus den konstruierten BAC-Mutanten wurde durch Transfektion in murine 10.1 Zellen Virus rekonstituiert und für die weitere phänotypische Charakterisierung der eingebauten Mutationen verwendet. Es wurde ebenfalls versucht, aus der M112/113 Deletionsmutante M112::*zeo*<sup>R</sup> Virus zu rekonstituieren allerdings, auch nach mehrmaliger Wiederholung, ohne Erfolg. Dies deutet darauf hin, dass es sich hierbei um eine für MCMV essentielle Genregion handelt oder dass das Wachstum dieser Mutante sehr stark attenuiert ist. Eine Rekonstitution müsste folglich anhand von komplementierenden Zellen erfolgen. Dies steht im Gegensatz zu HCMV, dessen homologe Genregion UL112/113 als nicht essentiell eingestuft wurde (Yu et al. 2003). Die viralen Konstrukte RevM112 und M112*mut*, die die Genregion wieder beinhalten und auf M112::*zeo*<sup>R</sup> basieren, konnten dagegen leicht rekonstituiert werden. Somit

kann ein Auftreten von weiteren Mutationen, die das Wachstum von M112::*zeo*<sup>R</sup> behindern ausgeschlossen werden, insbesondere auch deswegen, weil RevM112 in späteren Experimenten einen ähnlichen Phänotyp wie MCMV/wt zeigte. Die fehlgeschlagene Rekonstitution von M112::*zeo*<sup>R</sup> kann also direkt auf die Deletion des Genbereichs M112/113 zurückgeführt werden.

Um nun zu testen, welchen Einfluss die in den MCMV/wt-BAC eingebauten Mutationen bei Infektion humaner Zellen ausüben, wurden Infektionsstudien durchgeführt. Hierbei wurde beobachtet, dass Viren, die eine mutierte M112/113 Genregion besitzen, in der Lage sind, in humanen Zellen zu replizieren und eine permissive Infektion zu etablieren. Nach einiger Zeit war deutlich die Ausbildung von Infektionsherden und Plaques zu erkennen. Viren mit Wildtypsequenz M112/113 zeigen dagegen keinerlei Replikationsfähigkeit (Abbildung 14A).



**Abbildung 14: Phänotypische Charakterisierung der konstruierten M112/113 Mutanten.** (A) Humane RPE-1 Zellen wurden mit niedriger MOI mit RevM112 und M112mut infiziert. Die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des GFP-Signals wurde 7 Tage nach Infektion gemacht. Gezeigt sind hier jeweils zwei verschiedene Infektionsherde unabhängiger Infektionsansätze. (B) Analyse der Replikationsfähigkeit in humanen RPE-1 Zellen mit Hilfe einer Wachstumskurve mit einer MOI von 0,2 TCID<sub>50</sub>/Zelle. Zu den angegebenen Tagen wurde das Medium entnommen und die Virusmenge im Überstand durch Titration bestimmt. (C) MTT-Vitalitätstest zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion mit einer MOI von 5 TCID<sub>50</sub>/Zelle.

Um die Stärke der Replikationsfähigkeit genauer zu bestimmen, wurde eine Wachstumskurve angesetzt und über 15 Tage hinweg analysiert. Tatsächlich ist M112mut in der Lage, in humanen RPE-1 Zellen zu replizieren. Allerdings zeigte sich hierbei, dass die Replikation mit

einer deutlichen Zeitverzögerung im Vergleich zu MCMV/h abläuft (Abbildung 14B). MCMV/h erreicht 7 Tage nach Infektion den Tierhöchststand von circa  $1 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>/ml während M112*mut* erst nach 15 Tagen einen Titer von circa  $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml erreicht, also etwa eine Zehnerpotenz niedriger als MCMV/h (Abbildung 14B). Nach 15 Tagen musste die Beobachtung der Wachstumskurve abgebrochen werden, da die Zellen zu dicht waren, starben bzw. begannen sich abzulösen. Das Virus RevM112 hingegen zeigt, genauso wie der Wildtyp, keinerlei Wachstum in den humanen Zellen. Das Kontrollvirus MCMV/bclX<sub>L</sub>, welches durch Expression von BclX<sub>L</sub> in der Lage ist, in humanen Zellen zu wachsen (Jurak und Brune 2006), zeigt zwar ein leichtes Wachstum, allerdings mit einer noch geringeren Effizienz als M112*mut* (Abbildung 14B).

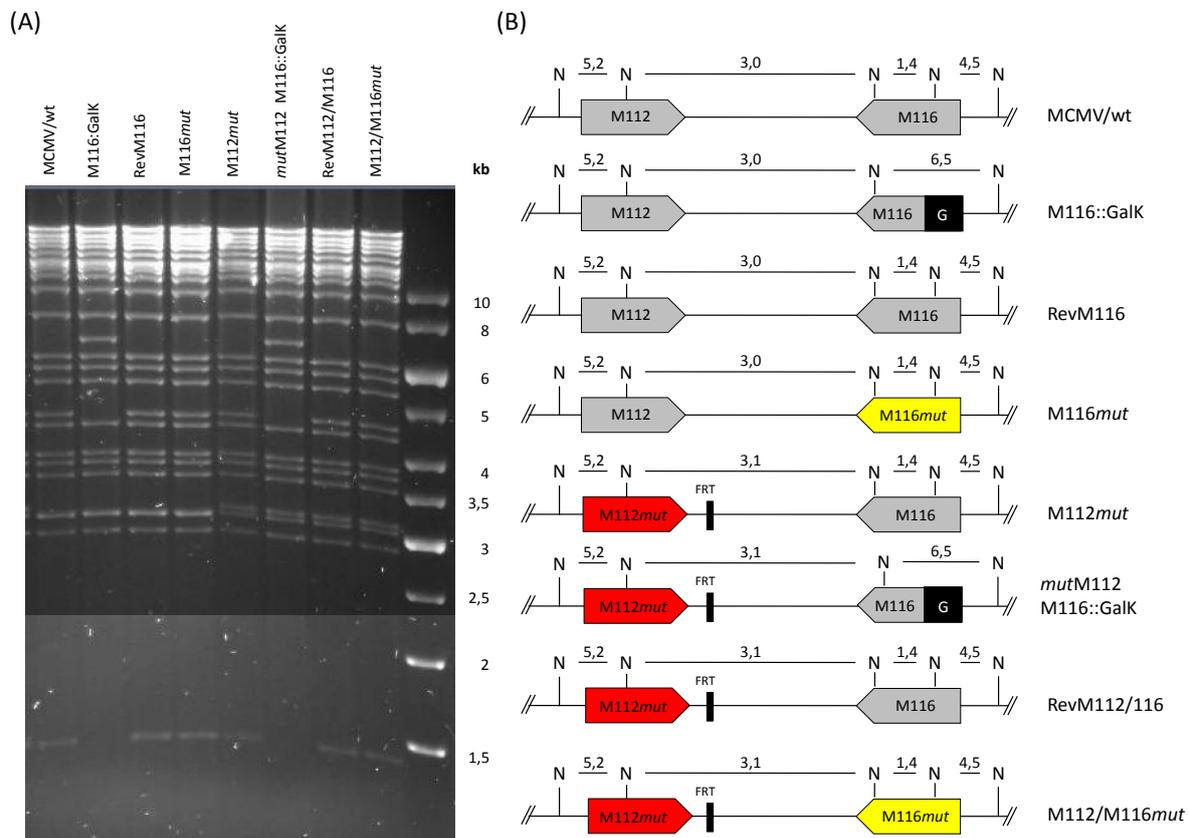
Da MCMV/h die Zellvitalität infizierter Zellen langsamer reduziert als MCMV/wt sollte untersucht werden, ob es hierbei einen Einfluss der M112/113 Mutationen gibt. Hierzu wurde erneut ein MTT-Vitalitäts-Test mit dem Kontrollvirus MCMV/UL37x1 durchgeführt (vgl. Abschnitt 3.2.1). Infektionen mit MCMV/wt und der Revertante RevM112 lösen einen Rückgang der Vitalität mit einer vergleichbaren Kinetik aus (Abbildung 14C). Im Gegensatz dazu, zeigen Viren, die eine mutierte M112/113 Genregion besitzen, eine unterschiedlich stark ausgeprägte Vitalitätsreduktion. MCMV/h löst, wie erwartet, einen deutlich schwächeren Rückgang der Zellvitalität im Vergleich zu MCMV/wt aus (Abbildung 6B, Abbildung 14C). Dieser Effekt zeigt sich zwar ebenfalls auch nach einer Infektion mit M112*mut*, allerdings ist dieser hierbei schwächer ausgeprägt (Abbildung 14C).

Die Mutationen im Genbereich M112/113 üben also tatsächlich einen positiven Einfluss bei Infektion nicht-permissiver humaner Zellen aus. Zwar sind diese Mutationen für sich genommen schon ausreichend, aber sie tragen nicht in vollem Umfang zur Ausbildung des Phänotypen von MCMV/h bei. Die konstruierte Mutante M112*mut* zeigt schwächeres und langsames Wachstum in RPE-1 Zellen und einen schwächeren Schutz vor Rückgang der Zellvitalität nach Infektion. Es ist also wahrscheinlich, dass noch weitere Mutationen eine wichtige Rolle beim Wachstum in speziessfremden Zellen spielen.

### 3.4.2 Untersuchungen zum Einfluss der Mutationen in M116

Wie in Tabelle 3 dargestellt, wurden im Genbereich M116 bei MCMV/h vier Nukleotidaustausche gefunden, die zu vier Aminosäuresubstitution führen. Bei diesem hypothetischen ORF handelt es sich um ein homolog zu HCMV UL116 (Rawlinson et al. 1996). Über die Funktion ist bisher nichts bekannt. Computergestützte Analysen sagen ein hypothetisches Glykoprotein mit einer Größe von 66kDa voraus. Es wäre somit denkbar, dass dieses Protein eine wichtige Funktion im Rahmen einer artfremden Infektion spielen kann.

Um dies zu testen, wurde mit Hilfe der BAC-Technologie und dem Selektionsmarker *Galk* eine BAC-Mutagenese durchgeführt. Die gefundenen Mutationen wurden in den Wildtyp-BAC und in den bereits vorhandenen BAC M112*mut* eingebaut, um zu testen, ob es additive Effekte durch diese Doppelmutationen M112/M116 gibt (Abbildung 15).



**Abbildung 15: Restriktionsverdau und Schema der konstruierten M116-BAC-Klone mit mutierter Genregion.** (A) Je 1,5  $\mu$ g der isolierten BAC-DNA wurden zur Kontrolle mit *NheI* restringiert und die Fragmente anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. Fragmente, die kleiner sind als 1,4 kb wurden nicht analysiert, da keine Änderung zu erwarten war. (B) Schematische Darstellung der BAC-Konstrukte mit den zu erwartenden Fragmentunterschieden nach einem Restriktionsverdau mit *NheI*. Schnittstellen für *NheI* sind durch ein N gekennzeichnet. (G, Selektionsmarker *Galk*-Gen; Rev, Revertante; *mut*, mutierte Sequenz)

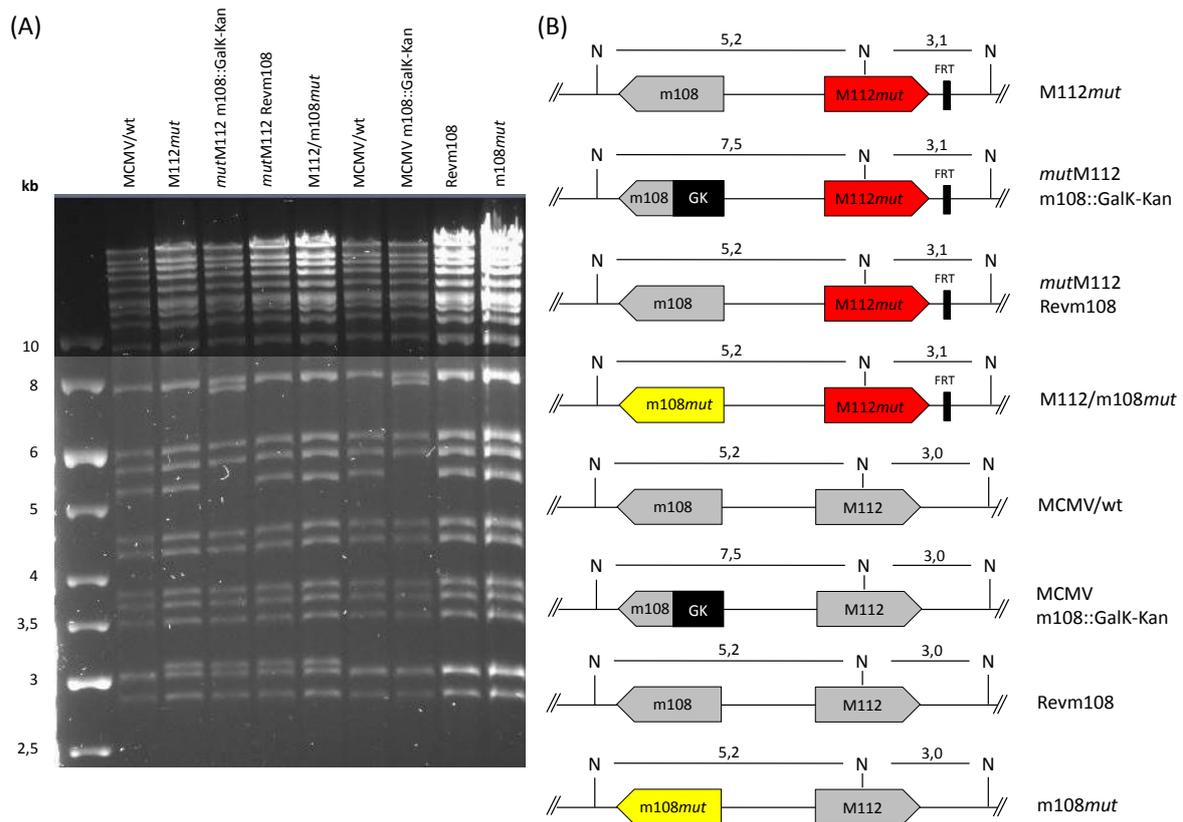
Nachdem die Korrektheit der verschiedenen BAC-Mutanten mittels Restriktionsverdau bestätigt war, wurden zusätzlich Sequenzierungen durchgeführt, um den Einbau der Punktmutationen zu bestätigen und um zusätzliche aber ungewollte Mutationen (PCR-Artefakte) zu detektieren. Dieser Schritt war nötig, da das *Galk*-Rekombinationssystem keine zusätzlichen Sequenzen bei der Reversion zurücklässt und das Restriktionsmuster folglich dem des maternalen BACs gleicht. Richtige BAC-Konstrukte wurde genutzt, um durch Transfektion in murine 10.1 Zellen Virusmutanten zu rekonstituieren. Diese Mutanten wurden für Infektionsstudien in humanen RPE-1 Zellen genutzt.

Wie sich dabei herausstellte, hat die M116 Einzelmutation keinen Einfluss auf das Wachstum in RPE-1 Zellen. Infizierte Zellen wurden apoptotisch und es konnte keine Virusausbreitung detektiert werden (nicht abgebildet). Auch ein additiver Effekt auf das Wachstum in der bereits getesteten Mutante M112*mut* konnte nicht festgestellt werden. Diese Doppelmutante zeigte eine ähnlich starke und verzögerte Replikationsfähigkeit in den humanen Zellen wie M112*mut* alleine (nicht abgebildet). Somit kann ein deutlicher Einfluss der hypothetischen Genregion M116 bei einer MCMV/h Infektion in artfremden humanen Zellen ausgeschlossen werden.

### 3.4.3 Untersuchungen zum Einfluss der Mutationen in m108

Wie im Falle von M116, wurde in MCMV/h eine Mutation im Genbereich m108 gefunden, die nicht in MCMV/wt-BAC zu finden war. Hierbei handelt es sich um eine Deletion der Nukleotide an den Positionen 162364 - 162385 (Tabelle 3). Diese Deletion ist umso interessanter, da in diesem Bereich eine miRNA codiert ist, über deren Funktion noch nichts bekannt ist (Buck et al. 2007, Dölken et al. 2007). Es wäre also denkbar, dass das Fehlen dieser miRNA eine wie auch immer geartete Fehlregulierung des Zielgens verursacht, wodurch MCMV/h in der Lage sein könnte, in artfremden humanen Zellen zu wachsen. Um dies zu testen, wurden wiederum BAC-Mutagenesen durchgeführt. Diesmal wurde allerdings als Selektionsmarker die *Galk-Kan*-Kassette benutzt, die eine schnellere Selektion positiver Klone im ersten Schritt über die erworbene Kanamycinresistenz erlaubt. Die Deletion im m108 Genbereich wurde wiederum im MCMV/wt-BAC vorgenommen und ebenfalls in M112*mut*, um mögliche additive Effekte zu detektieren. Aus den erhaltenen Klonen wurde BAC-DNA isoliert, verdaut und mittels Gelelektrophorese deren Richtigkeit bestätigt (Abbildung 16). Zusätzlich wurden die revertanten BAC-Konstrukte wieder sequenziert, um den Einbau der Deletion zu bestätigen und um ungewollte Artefakte ausschließen zu können. Nach Rekonstitution der Virusmutanten wurden Infektionsstudien in humanen RPE-1 Zellen durchgeführt.

Hierbei zeigte sich, dass weder in der Einzelmutante m108*mut* noch in der Doppelmutante M112/m108*mut* ein positiver Effekt auf das Wachstum in humanen Zellen zu erkennen ist. Infizierte Zellen wurden apoptotisch und starben nach Infektion mit dem Virus m108*mut*. Folglich konnte dieses keine lytische Replikation etablieren. Doppelmutante Viren M112/m108*mut* zeigten dagegen einen Phänotypen, der der Einzelmutante M112*mut* nahe kam (nicht abgebildet). Das Fehlen der miRNA im Genbereich m108, welche in MCMV/h deletiert ist, übt also keinen Einfluss und keinen additiven Effekt auf das Wachstum in den speziessfremden humanen RPE-1 Zellen aus.

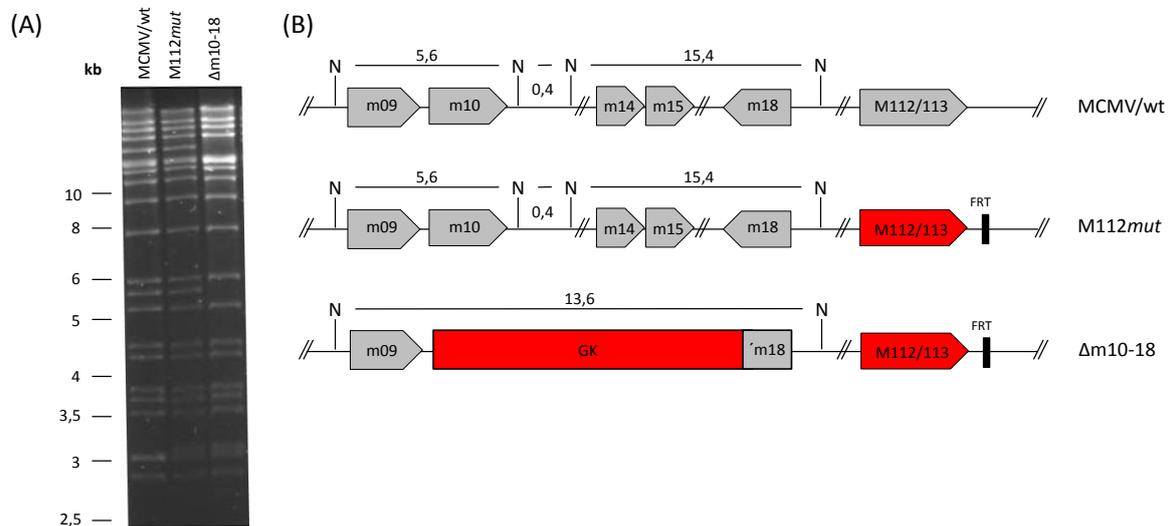


**Abbildung 16: Restriktionsverdau und Schema der konstruierten BAC-Mutanten mit Deletion in m108.** (A) Restriktionsanalyse der konstruierten BAC-Konstrukte nach Verdau mit *NheI*. Hierfür wurden 1,5 µg der jeweiligen DNA restringiert und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. Fragmente, die kleiner sind als 2,5 kb wurden nicht analysiert, da keine Änderung zu erwarten war. (B) Schema der verschiedenen BAC-Konstrukte mit Angabe der jeweils zu erwartenden Banden nach *NheI* Restriktion, wobei N die Position der Schnittstelle angibt. Die vorhergesagten Banden konnten im BAC-Gel bestätigt werden. (GK, Selektionsmarker *Galk*-Kanamycin-Kassette; Rev, Revertante; *mut*, mutierte Sequenz)

### 3.4.4 Untersuchungen zum Einfluss des genetischen Rearrangements m09-m18

Wie in Abschnitt 3.3.1 bereits dargestellt, lies sich ein genetisches Rearrangement im Genom von MCMV/h feststellen, bei dem es zu einer großen Deletion im Genbereich m10 - 18 kam. Um nun zu testen, ob hierdurch Gene deletiert wurden, die eventuell die Replikation in humanen RPE-1 Zellen behindern könnten, wurde auf der Basis der Mutante M112mut eine neue Mutante erstellt, in der dieser Genbereich deletiert worden ist. Zur Konstruktion wurde hierfür ebenfalls wieder das *Galk-Kan*-System verwendet, wobei diesmal keine Reversion der inserierten Selektionsmarker durchgeführt wurde. Als BAC-Ausgangskonstrukt wurde M112mut verwendet, um zu testen, ob es bei Deletion von m10 - m18 und gleichzeitiger Mutation der Genregion M112 einen additiven Effekt gibt. Nach *NheI* Restriktion der erstellten BAC-Konstrukte wurde das DNA-Bandenmuster durch elektrophoretische Auftrennung der Fragmente analysiert (Abbildung 17). Der deletierte Bereich im BAC-Konstrukt in  $\Delta$ m10 - 18 erstreckt sich von pos. 9561 - 19848 im Genom, also genau der

Bereich, der auch in MCMV/h deletiert ist. Dieser Bereich kodiert hauptsächlich Proteine, die der Glykoproteinfamilie m02 angehören (Rawlinson et al. 1996), und eine wichtige Rolle bei Abwehr der Immunantwort im Wirtsorganismus spielen (Oliveira et al. 2002).



**Abbildung 17: Restriktionsverdau und Schema der konstruierten Deletionsmutanten im Bereich m10 - m18.** (A) Je 1,5 µg BAC-DNA wurde mit dem Restriktionsenzym *NheI* restringiert und die Fragmente wurden mittels Elektrophorese aufgetrennt. Fragmente, die kleiner sind als 2,5 kb wurden nicht analysiert, da keine Änderung zu erwarten war. (B) Schema der zu erwartenden Änderungen im Bandenmuster nach einem *NheI* Verdau. Die Schnittstellen für *NheI* sind mit N markiert und die jeweils zu erwartenden Bandengrößen angegeben. Die Deletionsmutante Δm10 - 18 basiert auf dem Konstrukt M112mut. (GK, Selektionsmarker *GalK*-Kanamycin-Kassette; mut, mutierte Sequenz)

Aus dem BAC-Deletionskonstrukt Δm10 - 18 wurde durch Transfektion in murine Zellen wiederum Virus rekonstituiert und dieses in Infektionsanalysen eingesetzt. Hierbei zeigte sich, dass der Einbau der Deletion Δm10 - 18 in M112mut keinen Einfluss auf das Wachstum in humanen RPE-1 Zellen hat (nicht abgebildet). Das Virus, mit mutiertem M112 Genbereich und der Deletion, zeigte eine ähnliche Wachstumskinetik und Intensität wie die Einzelmutante M112mut.

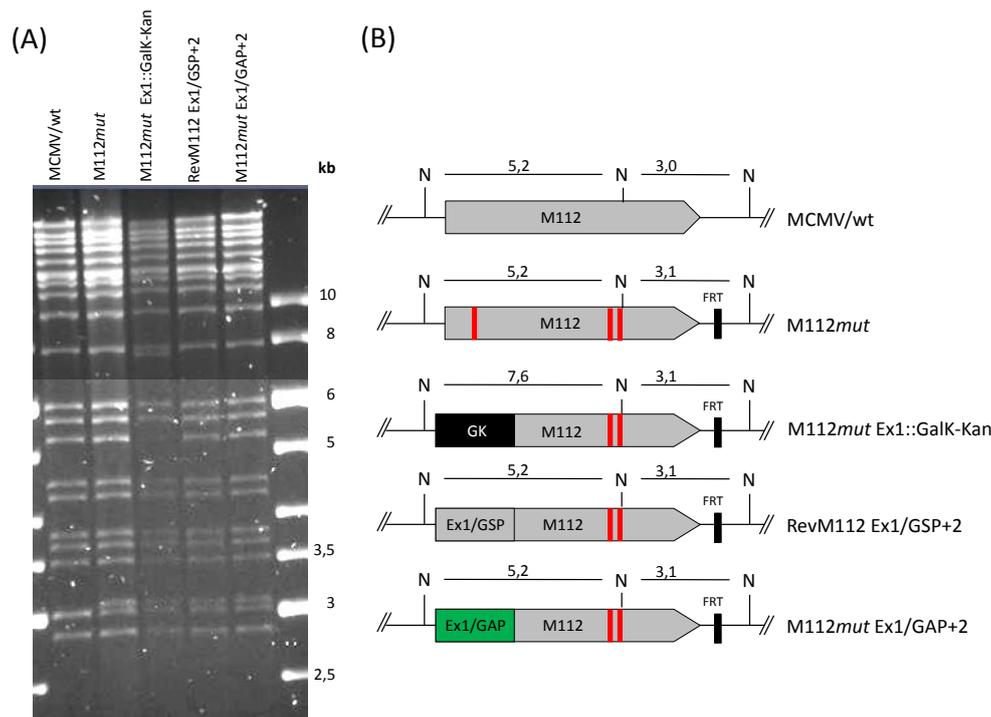
### 3.4.5 Zusammenfassung der Genomanalyse

Nach bisherigem Sequenzierungsstand konnte keine weitere Mutation gefunden werden, die nur in MCMV/h und nicht in MCMV/wt vorkommt. Somit stellt die Mutation in M112/113 bisher die einzige Mutation dar, für die ein deutlicher Einfluss bei einer speziefremden Infektion in humanen Zellen gezeigt werden konnte. Deshalb sollte untersucht werden, welchen Einfluss diese Mutationen in M112/113 auf molekularer Ebene ausüben.

### 3.5 Einzelmutationsanalyse in M112/113

Wie bereits in Abschnitt 3.4.1 dargestellt, wurden in der Genregion M112/113 mehrere Mutationen gefunden, die zu einer Änderung der Aminosäuresequenz der jeweils betroffenen E1 Proteinisoformen führen. Alle Isoformen sind von der Deletion des Aminosäuresequenzmotives GSP betroffen und nur die größte aller Isoformen besitzt zusätzlich zwei Aminosäureaustausche (Abbildung 12). Diese MCMV Genregion ist homolog zur Genregion UL112/113 von HCMV. Von den dort kodierten Proteinen weiß man, dass sie posttranslational phosphoryliert werden und im Kern lokalisiert sind (Wright und Spector 1989). Es ist daher anzunehmen, dass die murinen Proteine ebenfalls posttranslational phosphoryliert werden können. Phosphorylierungen gehen meist mit einer veränderten Proteinaktivität einher. Somit ist es vorstellbar, dass die Deletion der potentiellen Phosphorylierungsstelle (Ser<sub>9</sub>) einen immensen Einfluss auf die Aktivität ausüben kann. Unterstützung findet diese Hypothese durch computergestützte Analysen, die potentielle Phosphorylierungsstellen vorhersagen. Netphos2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>), ein Programm zur Vorhersage potentieller Phosphorylierungsstellen, sagt tatsächlich mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit voraus, dass es sich bei dem im deletierten Motiv enthaltenen Ser<sub>9</sub> um eine mögliche Phosphorylierungsstelle handelt.

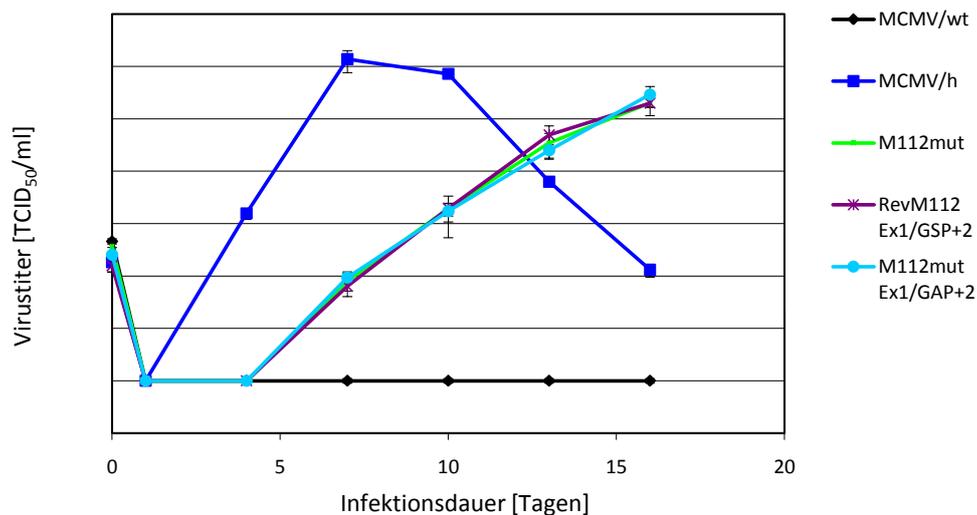
Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde eine zielgerichtete Mutagenese des Ser<sub>9</sub> durchgeführt. Der MCMV/wt M112-Genbereich, der kloniert in pFlagCMV5a vorlag, diente hierfür als Ausgangskonstrukt und das Ser<sub>9</sub> (GSP) wurde mittels PCR in ein Ala<sub>9</sub> (GAP) mutiert. Zur Überprüfung wurde dieses Konstrukt sequenziert (nicht gezeigt) und diente letztlich als Grundlage zur Herstellung eines PCR-Fragmentes für eine BAC-Rekombination (Abbildung 18). Ausgangskonstrukt dieser BAC-Rekombination war M112*mut*, das bereits die analysierten Mutationen in M112 beinhaltet. Im ersten Schritt wurde die *Galk-Kan*-Kassette in das Exon 1 inseriert. Diese wurde anschließend entweder durch ein Fragment ausgetauscht, das das Wildtyp-Motiv GSP oder das mutierte Motiv GAP trug. Die beiden anderen Mutationen im Exon 3 von M112, die nur die große Isoform betreffen, blieben jedoch in beiden Konstrukten erhalten (Abbildung 18). Nachdem diese Konstrukte mittels Restriktionsverdau analysiert und im Rekombinationsbereich sequenziert waren, konnte durch Transfektion in murine Zellen Virus rekonstituiert werden. Deren Wachstum wurde in humanen RPE-1 Zellen mittels einer Wachstumskurve analysiert (Abbildung 19).



**Abbildung 18: Zielgerichtete Mutagenese zur Untersuchung des Einflusses der potentiellen Phosphorylierungsstelle an Position Ser<sub>9</sub>.** (A) Analyse der konstruierten BACs nach Restriktionsverdau mit *NheI* und elektrophoretischer Auftrennung der Fragmente. Fragmente kleiner als 2,5 kb sind hier nicht gezeigt, da keine Änderungen zu erwarten waren. (B). Schematische Übersicht der konstruierten BAC-Mutanten. Angegeben sind jeweils die Schnittstellen für *NheI* und die daraus resultierenden Fragmente nach erfolgreicher Mutagenese. Die roten Balken stellen die in M112 gefundenen Mutationen in Exon 1 und Exon 3 dar. Die durchgeführte Mutagenese betrifft nur Exon 1. (*mut*, mutierte Sequenz; GK, *Galk*-Kanamycin-Kassette; Ex, Exon; Rev, Revertante; GAP, mutiertes Wildtypmotiv; GSP, Wildtypmotiv)

Mit Hilfe dieser Wachstumsanalyse konnten wichtige Erkenntnisse gewonnen werden. Wie die Untersuchung des Wachstumsverhaltens in den humanen RPE-1 Zellen ergab, spielt die Deletion der potentiellen Phosphorylierungsstelle keine Rolle. Die Virusmutante M112mut Ex1/GAP+2 zeigt ein ähnliches Replikationsverhalten wie RevM112 Ex1/GSP+2. Beide erreichen nach ca. 16 Tagen den gleichen Endtiter. Dieser liegt aber wiederum um dem Faktor zehn unter dem von MCMV/h (Abbildung 19). Dies zeigt, dass die potentielle Phosphorylierungsstelle keinen Einfluss auf das Wachstum ausübt.

Gleichzeitig konnte mit diesen beiden Mutanten gezeigt werden, dass die Deletion des Motives GSP ebenfalls zu vernachlässigen ist. Die Revertante RevM112 Ex1/GSP+2 besitzt lediglich nur die Mutationen, die zu einer Änderung in der großen Isoform der E1 Proteine führen (Abbildung 18). Trotzdem ist dieses Virus in der Lage, mit der gleichen Kinetik in den humanen Zellen zu wachsen wie M112mut, das die Deletion im Exon 1 noch trägt (Abbildung 19).



**Abbildung 19: Wachstumsanalyse der konstruierten GSP/GAP-Mutanten in humanen RPE-1 Zellen nach Infektion mit einer MOI von 0,2 TCID<sub>50</sub>/Zelle.** Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Bestimmung des Virustiters im jeweiligen Überstand erfolgte mittels Titration.

Zusammengefasst zeigen diese Experimente deutlich, dass nur die beiden Aminosäureaustausche in der großen Isoform der M112/113 Proteine nötig sind, um ein Wachstum von MCMV/wt in humanen Zellen zu bewerkstelligen. Es scheint also, dass die Deletion des Motives GSP keinen Einfluss auf den Phänotypen hat. Nichtsdestotrotz handelt es sich hierbei um eine Mutation, die nur in MCMV/h gefunden wurde und nicht in MCMV/wt. Eventuell spielt diese Mutation eine untergeordnete Rolle, die sich mit diesen Ansätzen nicht analysieren lässt. Deshalb wurde entschieden, die weiteren Untersuchungen trotzdem mit der Mutante M112mut durchzuführen, in der alle detektierten Mutationen in M112/113 eingebaut wurden.

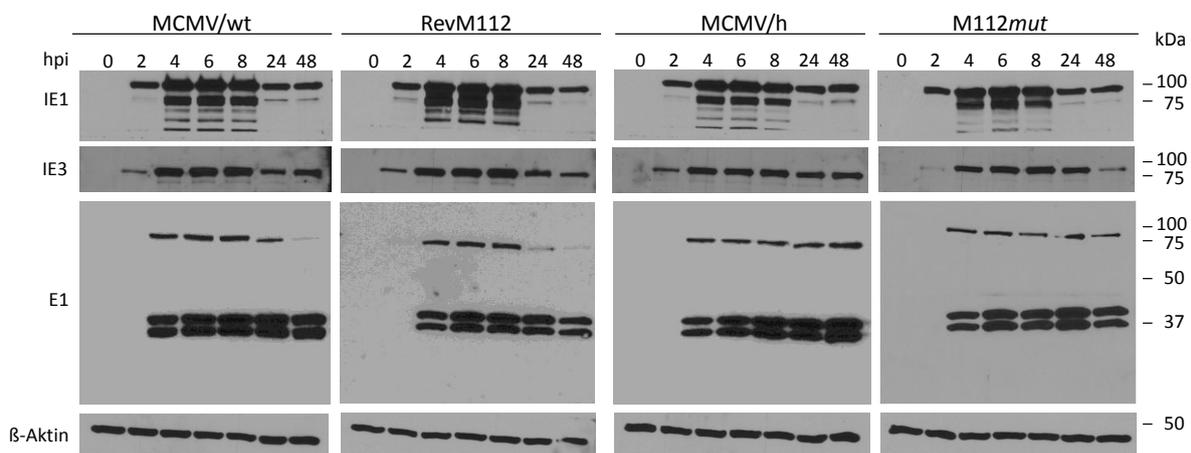
Auffallend bei den bisher konstruierten Mutanten ist, dass sie alle ein verzögertes Wachstum im Vergleich zu MCMV/h aufweisen. Allen gemeinsam ist die inserierte FRT-Sequenz, die durch Entfernen der Kanamycin-Kassette zurückblieb. Es gibt Hinweise darauf, dass sich innerhalb der FRT-Sequenz eine kryptische Spleißstelle befindet. Da ausgehend vom Genbereich M112/113 verschiedene Proteinisoformen durch alternatives Spleißen synthetisiert werden, kann deshalb eine mögliche Interferenz nicht komplett ausgeschlossen werden. Diese könnte möglicherweise einen negativen Einfluss auf das Wachstum dieser Mutanten haben und die langsamere Replikation erklären.

Um diese Hypothese zu testen, wurden mit Hilfe des *Galk-Kan*-Systems die Mutationen nochmals einzeln und in Kombination in den MCMV/wt-BAC inseriert (vgl. Abschnitt 2.2.2.14.3), wobei diesmal keine FRT-Sequenzen oder sonstige Artefakte zurückblieben (nicht abgebildet).

Hierbei zeigte sich erneut, dass Mutanten mit den beiden Mutationen, die nur die große E1 Isoform betreffen, in der Lage waren in humanen RPE-1 Zellen zu wachsen. Dieses Wachstum war unabhängig von der Anwesenheit oder der Deletion des GSP Motives in Exon 1. Mutanten, die nur die Deletion  $\Delta$ GSP im Exon 1 trugen, zeigten dagegen kein Wachstum in den humanen Zellen. Allerdings zeigte sich auch bei dieser Rekonstruktion der M112/113-Mutanten, dass das Fehlen der FRT-Sequenz keine Beschleunigung oder Verstärkung des Wachstums in den humanen Zellen mit sich brachte (nicht abgebildet). Alle FRT-freien Viren zeigten ein ähnliches Wachstumsverhalten in den humanen RPE-1 Zellen wie M112mut.

### 3.6 Expressionskinetikanalyse IE3 und E1

Wie bereits beschrieben, sind bisher vier verschiedene M112/113 Proteinisoformen mit einem Molekulargewicht von 33, 36, 38 und 87 kDa identifiziert worden (Ciocco-Schmitt et al. 2002). Deshalb sollte untersucht werden, ob die Mutationen einen Einfluss auf das Expressionsmuster der verschiedenen Isoformen ausüben. Insbesondere die große E1 Isoform ist hier von Interesse, da deren alleinige Mutation ausreichend für das Wachstum in humanen Zellen ist (Abbildung 19). Hierzu wurden humane Zellen infiziert, nach verschiedenen Zeitabständen lysiert (0 bis 48 h) und die Expression der Proteine mittels Western Blot analysiert (Abbildung 20).



**Abbildung 20: Western Blot Expressionsanalyse von IE1, IE3 und den M112/113 Proteinisoformen nach Infektion humaner Zellen.** RPE-1 Zellen wurden mit einer MOI von 5 TCID<sub>50</sub>/Zelle infiziert, nach den angegebenen Zeitpunkten geerntet und lysiert. Der spezifische Nachweis der Proteine erfolgte mittels Western Blot. IE1 bzw.  $\beta$ -Aktin dienten hierbei als Infektions- bzw. Ladekontrollen. (IE1, immediate-early-1 Protein; IE3, immediate-early-3 Protein; E1, early Proteine der M112/113 Region)

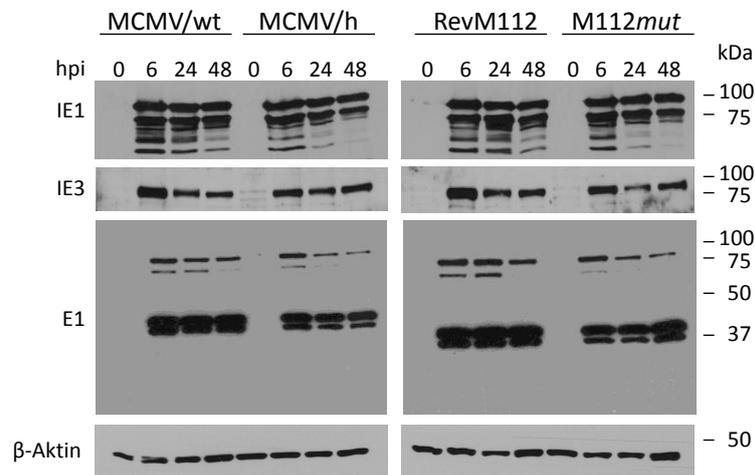
Wie zu erwarten war, startet die Expression der E1 Isoformen 4h nach Infektion, wobei initial kaum Expressionsunterschiede zwischen den verschiedenen Mutanten detektiert werden konnten. Deutlich sieht man, dass die kleinen 36 und 38 kDa Isoformen stärker exprimiert werden als die große 87 kDa E1 Isoform. Dies ist bei allen getesteten Virusmutanten der Fall. (Abbildung 20). Die 33 kDa Bande der kleinsten E1 Isoform konnte allerdings nicht detektiert werden, da der verwendete CHROMA 103 Antikörper diese nicht detektiert. Dies könnte damit zusammenhängen, dass der Antikörper ein Epitop in Exon 2 erkennt und dieses in der 33 kDa Form nicht zu finden ist (Abbildung 12).

Zu späteren Zeitpunkten zeigen sich dagegen deutliche Unterschiede im Nachweis der großen 87 kDa E1 Isoform. 24 h nach Infektion der humanen Zellen mit MCMV/wt oder der Revertante RevM112 erkennt man eine Abnahme des Signals. 48 h nach Infektion ist schließlich keines mehr zu detektieren. Im Gegensatz hierzu sind 24 h und 48 h nach Infektion mit MCMV/h bzw. dessen BAC-Konstrukt M112*mut* noch deutliche Signale der großen E1 Isoform zu erkennen. Diese späten Signale unterscheiden sich kaum von der Expressionsstärke zu Beginn der Infektion (Abbildung 20).

Diese Beobachtung kann zwei Ursachen haben. Zum einen wäre es denkbar, dass die Mutationen in M112 die Proteinstabilität der großen E1 Isoform beeinflussen und deshalb zu späten Zeitpunkten ein Nachweis noch möglich ist. Oder es findet tatsächlich zu späteren Zeitpunkten nach Infektion mit MCMV/h und M112*mut* noch eine Proteinexpression dieser großen Isoform statt, wohingegen die Expression in MCMV/wt und M112*mut* infizierten Zellen negativ beeinflusst wird. Denkbar wäre hier wieder ein Einfluss der stärker induzierten Apoptose.

Es ist beschrieben, dass die 87 kDa Isoform von M112/113 mit IE3 interagiert und so dessen repressiven Effekt auf die Expression von IE1 und IE3 verhindert (Tang et al. 2005). Um zu testen, ob eine reduzierte Expression der 87 kDa Isoform auch zu einer verringerten Expression von IE1 und IE3 führt, wurden diese Proteine zusätzlich analysiert (Abbildung 20). Allerdings lassen sich hier keine offensichtlichen Unterschiede in der Expression bei zurückgehender Expression der 87 kDa Isoform feststellen. Wie zu erkennen ist, wird in humanen Zellen bereits 2 h Stunden nach Infektion IE1 und IE3 exprimiert. Die Virusmutante M112*mut* scheint hierbei eine etwas schwächere IE3 Expression zu haben, die aber bereits 4 h nach Infektion nicht mehr zu detektieren ist. Die Expression von IE1 und IE3 bleibt danach aber über den beobachteten Zeitraum bei allen Viren relativ stabil. Der beschriebene Mechanismus der Repression durch IE3 scheint hierbei also nur eine untergeordnete Rolle zu spielen oder er ist mit diesem System nur schwer zu analysieren.

Um zu testen, ob es sich bei der zurückgehenden Expression der großen 87 kDa Isoform um ein Phänomen handelt, das so nur in RPE-1 Zellen zu beobachten ist, wurden speziesspezifische murine 10.1 Zellen infiziert, lysiert und es wurde zeitaufgelöst die Expression der verschiedenen Proteine mittels Western Blot analysiert (Abbildung 21).



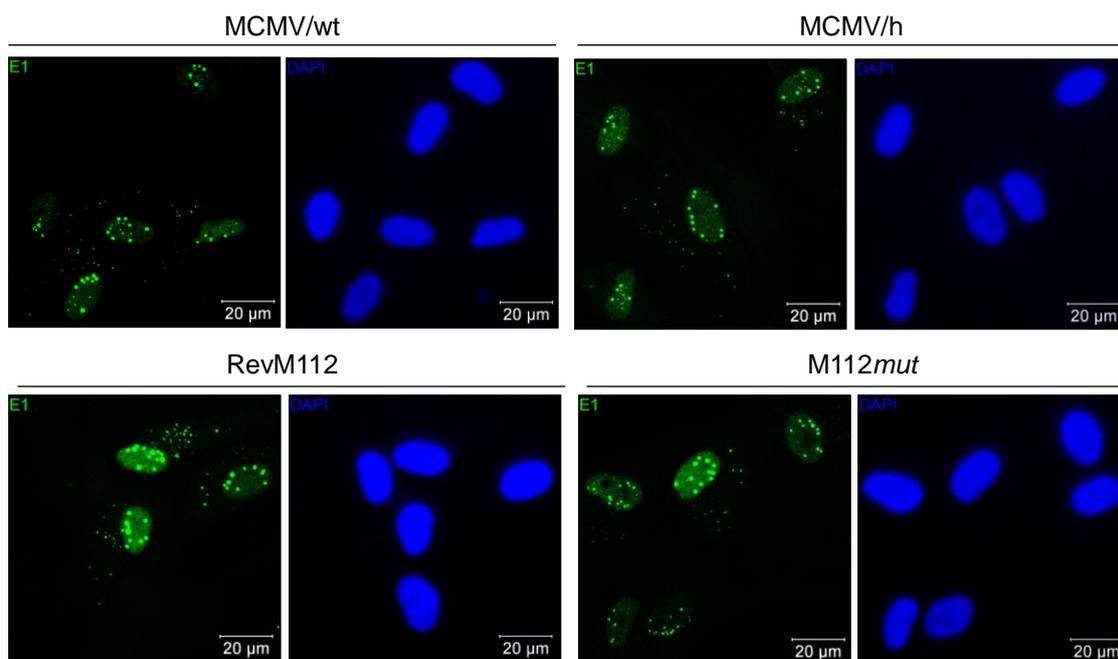
**Abbildung 21: Western Blot-Expressionsanalyse von IE1, IE3 und den E1 Isoformen in infizierten murinen 10.1 Zellen.** Diese wurden mit einer MOI von 5 TCID<sub>50</sub>/Zelle infiziert, zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und lysiert. Das Zelllysate wurde im Western Blot zum Nachweis der verschiedenen Proteine eingesetzt. Auch hier diente IE1 bzw. β-Aktin als Infektions- bzw. Ladekontrolle. (IE1, immediate-early-1 Protein; IE3, immediate-early-3 Protein; E1, early Proteine der M112/113 Region)

Die Analyse der E1 Isoformen nach Infektion mit den verschiedenen Viren zeigt, dass auch in den speziesspezifischen Zellen der Schwerpunkt der Expression auf den kleinen Isoformen liegt (Abbildung 21). Im Gegensatz zur Infektion in den humanen Zellen zeigt sich, unabhängig vom verwendeten Virus, dass auch 48 h nach Infektion noch deutliche Signale der großen 87 kDa Isoform detektierbar sind. Zusätzlich erkennt man eine weitere E1 Bande im oberen Bereich, bei es sich wohl um die noch nicht modifizierte Form der 87 kDa Bande handelt (Abbildung 21, vgl. Abbildung 12). Bei dieser Analyse zeigte sich auch, dass die IE1 und IE3 Expression in murinen 10.1 Zellen im beobachteten Zeitraum ebenfalls kaum variiert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Viren mit mutierter M112/113-Genregion sich in Bezug auf die E1 Isoformexpression nach Infektion humaner RPE-1 Zellen so verhalten wie in den speziesspezifischen 10.1 Zellen; alle Isoformen werden über einen längeren Infektionszeitraum konstant synthetisiert.

E1 Proteine sind maßgeblich am Aufbau der Replikationszentren im Nukleus und an der Rekrutierung wichtiger Replikationsfaktoren in infizierten Zellen beteiligt. Es stellte sich also nun die Frage, ob sich durch die Mutationen in M112/113 und das unterschiedliche Expressionsmuster Veränderungen an den Replikationskompartimenten feststellen lassen.

### 3.7 Untersuchungen zur Formation der Replikationskompartimente

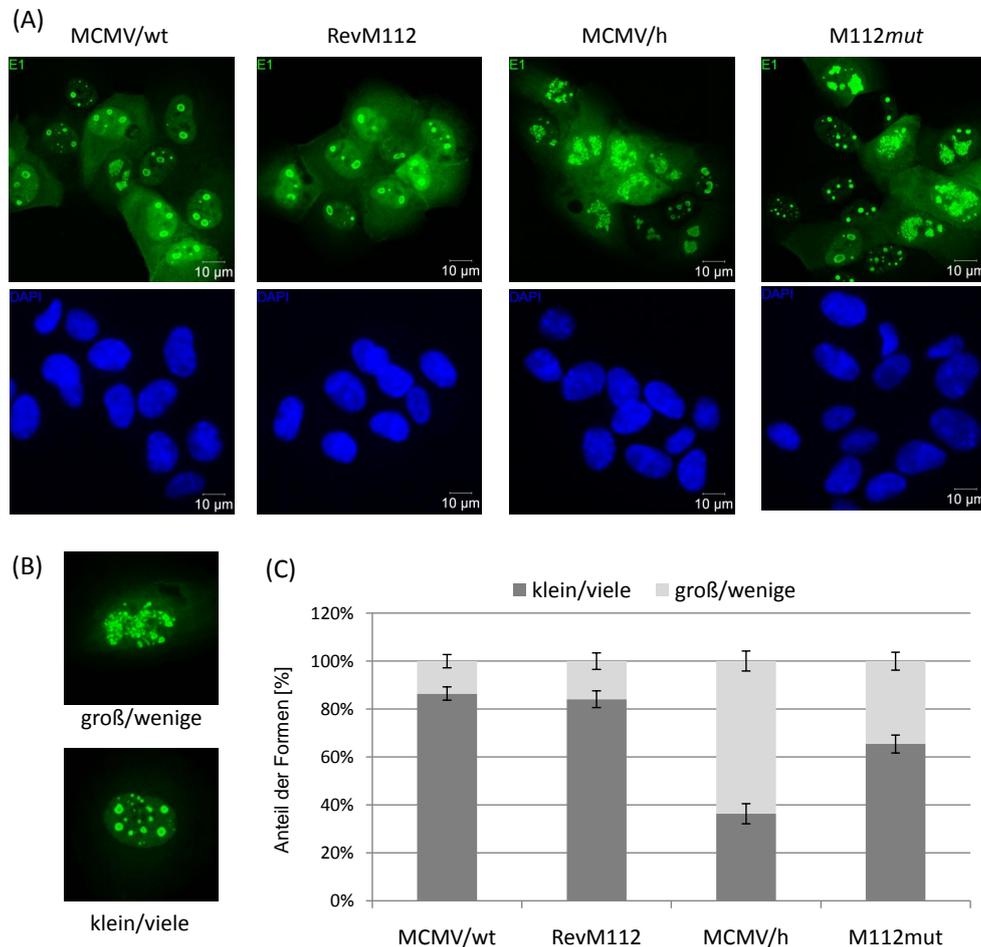
Die Expression der E1 Proteine ist circa 4 h nach Infektion im Western Blot deutlich detektierbar. Da es sich hierbei um nukleäre Phosphoproteine handelt, wäre es möglich, dass durch die Mutationen in M112/113 eine Änderung der Proteinlokalisierung verursacht wird. Deshalb sollte die Lokalisation innerhalb der infizierten Zellen in der sehr frühen Phase der Infektion (4 h nach Infektion) mittels Immunfluoreszenz analysiert werden (Abbildung 22). Immunfluoreszenzfärbungen der E1 Proteine in infizierten Zellen zeigen allerdings, dass die Mutationen in der M112/113-Region und die damit verbundenen Änderungen in der Aminosäuresequenz keinen Einfluss auf die Lokalisation innerhalb der Zelle haben. 4 h nach Infektion lässt sich eine eindeutige Kernlokalisierung in den humanen RPE-1 Zellen, neben einem gewissen cytoplasmatischen Anteil, nachweisen (Abbildung 22). Der Kerntransport, der für den Aufbau der Replikationskompartimente wichtigen E1 Proteine, ist also ebenfalls in artfremden Zellen möglich und ist nicht durch die Mutationen beeinflusst oder begünstigt.



**Abbildung 22: Immunfluoreszenzanalyse zur Detektion der E1 Proteine 4 h nach Infektion** Humane RPE-1 Zellen wurden mit einer MOI von 3 TCID<sub>50</sub>/Zelle mit den angegebenen Viren infiziert, 4 h danach fixiert und für eine Immunfluoreszenz zum Nachweis der E1 Proteine verwendet. Als Sekundärantikörper wurde ein Alexa488-gekoppelter Antikörper verwendet, so dass die E1 Proteine im grünen Kanal sichtbar wurden. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Die gezeigten Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Laserscanningmikroskop dokumentiert.

Da nun gezeigt war, dass die Kernlokalisierung der E1 Proteine in den artfremden Zellen nicht beeinflusst zu sein scheint, wurden Immunfluoreszenzanalysen zu späteren Zeitpunkten durchgeführt (Abbildung 23). 24 h nach Infektion sollten sich die Replikationszentren bereits

deutlich ausgebildet haben, aber es wurde noch keine starke Vitalitätsreduktion bzw. Apoptose ausgelöst (vgl. Abschnitt 3.2.1). Diese Vorgänge können natürlich einen negativen Einfluss auf die Ausbildung bzw. den Erhalt der Zentren ausüben.



**Abbildung 23: Analyse der Replikationskompartimentsbildung in infizierten humanen RPE-1 Zellen.** (A) Die Zellen wurden mit einer MOI von 3 TCID<sub>50</sub>/Zelle infiziert, 24 h später fixiert und die Färbung der E1 Proteine erfolgte mit Hilfe einer Immunfluoreszenz unter Verwendung eines spezifischen E1 Antikörpers. Als Zweitantikörper diente ein Alexa488-gekoppelter Antikörper, der die E1 Proteine im grünen Kanal sichtbar macht. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Alle Signale wurden mit einem konfokalen Laserscanningmikroskop detektiert. Gezeigt sind hier repräsentative Bildausschnitte. (B) Großaufnahmen der hauptsächlich anzutreffenden Formen der gebildeten Replikationskompartimente nach 24 h Infektion in humanen Zellen. Vergrößerte Ansicht aus (A). (C) Auszählung der verschiedenen Kompartimentsformen nach 24 h Infektion humaner RPE-1 Zellen. Hierzu wurden die Zellen mit einer MOI von 3 TCID<sub>50</sub>/Zelle infiziert und wie beschrieben gefärbt. Zur Auszählung wurden die Infektionen jeweils in Vierfachansätzen durchgeführt und jeweils mindestens 150 infizierte Zellkerne im Fluoreszenzmikroskop bewertet.

Wie in Abbildung 23 zu sehen ist, sind die verschiedenen MCMV-Abkömmlinge in der Lage, in den Kernen humaner Zellen Replikationskompartimente zu bilden. Deutlich ist dies an den E1 Aggregaten innerhalb der angefärbten Zellkerne zu erkennen (Abbildung 23A). Auffallend ist jedoch, dass die Kompartimente verschiedene Formen bzw. Ausprägungen aufweisen. Es gibt Replikationskompartimente, die meist singular vorliegen, „wolkig“ aussehen und dabei

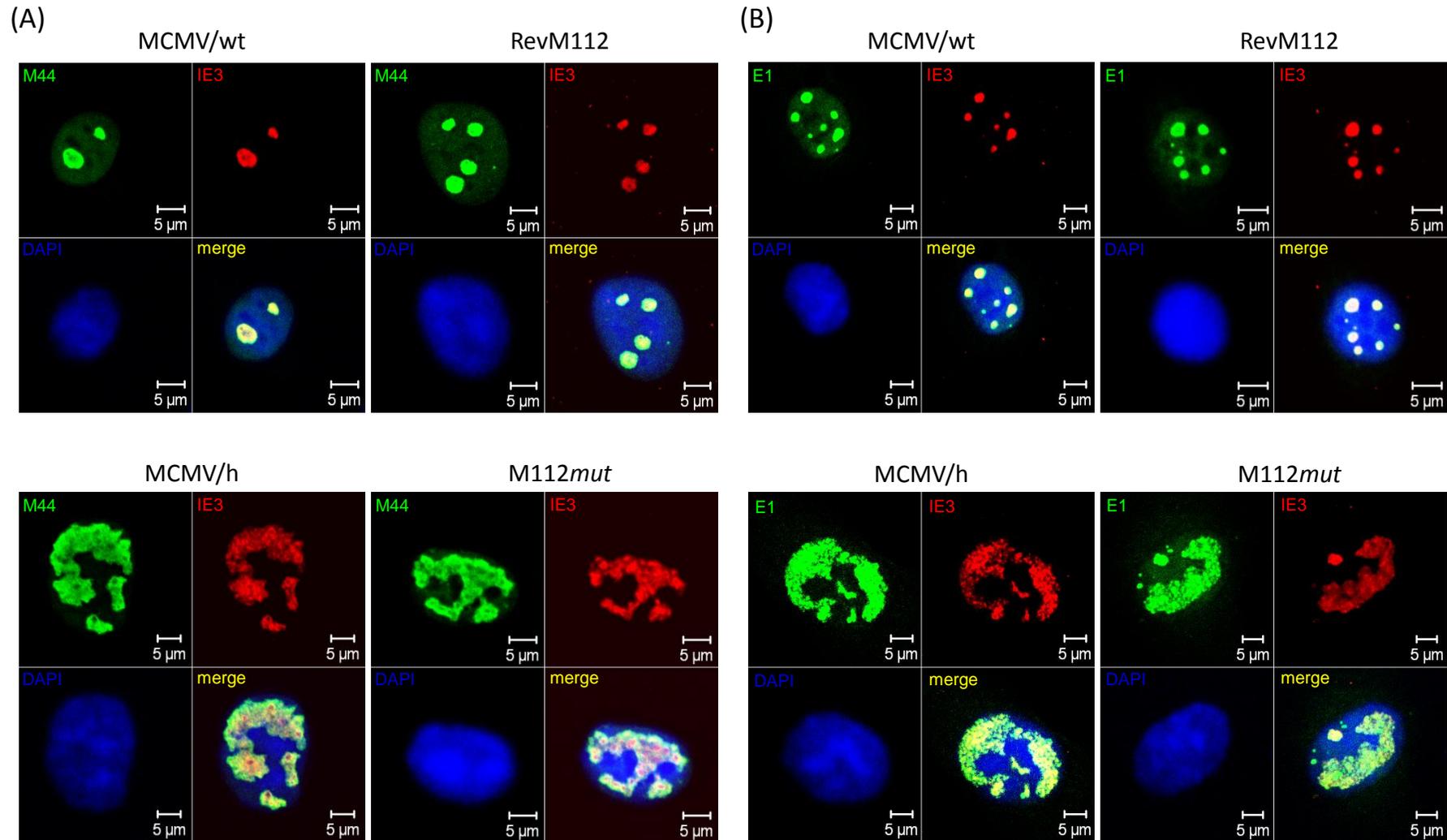
fast den ganzen Zellkern ausfüllen und insbesondere bei MCMV/h und M112*mut* anzutreffen sind. Dagegen gibt es aber auch Kompartimente, die eher ein kleines, rundlicheres Erscheinungsbild haben, nicht kernfüllend sind und dafür aber oft in großer Zahl zu finden sind (Abbildung 23B). Diese finden sich vermehrt in MCMV/wt und RevM112 infizierten Zellen.

Um diese Beobachtung besser einschätzen zu können, wurden RPE-1 Zellen infiziert, mittels Immunfluoreszenz für die E1 Proteine angefärbt und das Erscheinungsbild der Replikationskompartimente wurde anschließend nach den oben erwähnten zwei Formen (Abbildung 23B) bewertet. Pro Auszählung wurden jeweils mindestens 150 infizierte Kerne berücksichtigt. Die Auszählung erfolgte in Vierfachansätzen (Abbildung 23C). Tatsächlich ließ sich hierdurch bestätigen, dass MCMV/h und M112*mut* mit einem deutlich höheren Prozentsatz große und singuläre Replikationskompartimente ausbilden. MCMV/wt und RevM112 hingegen bilden hauptsächlich kleine Replikationskompartimente aus (Abbildung 23C). In diesen nukleären Replikationskompartimenten findet virale DNA-Replikation statt und diese ist nötig, um Virusnachkommen zu bilden (Ahn et al. 1999).

Es stellte sich also nun die Frage, ob die nicht-permissive Infektion humaner Zellen mit MCMV/wt unter anderem darin begründet liegt, dass die Replikationskompartimente nicht richtig aufgebaut werden können. Dies scheint nach dieser Beobachtung möglich zu sein. E1 Proteine sind ebenfalls an der Rekrutierung der zur Replikation nötigen Proteine beteiligt. Möglicherweise können aufgrund des suboptimalen Zusammenbaus der Zentren andere wichtige Faktoren der DNA-Replikation nicht oder nur ungenügend rekrutiert werden?

### **3.8 Untersuchungen zum Aufbau der Replikationskompartimente**

Der Aufbau der nukleären Replikationskompartimente ist ein komplexer Prozess, an dem viele verschiedene Proteine beteiligt sind und dessen Ablauf noch nicht genau verstanden ist. Allerdings konnte die Gegenwart der viralen DNA und bestimmter Proteine gezeigt werden, die spezifisch zu diesen Kompartimenten rekrutiert werden, folglich mit diesen kolo-kalisieren und in HCMV und MCMV infizierten Zellen zu finden sind. Zu diesen Proteinen gehören die E1 Proteine, die die Matrix zum Aufbau bereitstellen, die DNA-Polymerase Untereinheit M44 bzw. UL44 und die DNA-Polymerase selbst, sowie IE2 bzw. IE3 und DNA-Einzelstrangbindeproteine (Ahn et al. 1999, Tang et al. 2005, Yamamoto et al. 1998).



**Abbildung 24: Immunfluoreszenz auf Einzelzellebene zur Analyse des Aufbaus der Replikationskompartimente nach Infektion humaner Zellen.** RPE-1 Zellen wurden mit einer MOI von 3 TCID<sub>50</sub>/Zelle infiziert, 24 h später fixiert und zur Immunfluoreszenz-Analyse verwendet. Als Sekundärantikörper dienten Alexa488/grün- bzw. Alexa594/rot-gekoppelte Antikörper. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Gezeigt ist jeweils der Nachweis der Kolokalisation von (A) M44 und IE3 bzw. (B) E1 und IE3. Alle Bilder wurden mit einem konfokalen Laserscanningmikroskop aufgenommen.

Um zu untersuchen, ob die beschriebene Lokalisation und Rekrutierung der verschiedenen Faktoren in den humanen Zellen stattfinden kann und ob diese unabhängig von der Erscheinungsform der Replikationszentren ist, wurden Immunfluoreszenzen durchgeführt, wobei jeweils die Kolokalisation von M44/IE3 und E1/IE3 analysiert wurde (Abbildung 24). Hierbei zeigt sich deutlich, dass die E1 Proteine in den spezie fremden humanen Zellen perfekt mit der DNA-Polymerase Untereinheit M44 kolokalisieren. Sie müssen deshalb in der Lage sein, diese Untereinheit in die Replikationskompartimente zu rekrutieren. Dies geschieht sowohl bei einer Infektion der Zellen mit MCMV/h und M112*mut* als auch bei einer Infektion mit MCMV/wt und RevM112 und scheint somit unabhängig von der Gestalt der Replikationskompartimente zu sein (Abbildung 24A). IE3 und E1 Proteine zeigen ebenfalls eine perfekte Kolokalisation in den nukleären Replikationszentren und diese ist wie im Falle von M44 ebenfalls unabhängig von der Form (Abbildung 24B).

Die Ausbildung der Replikationskompartimente startet in der Nähe der „*promyelocytic leukemia protein-associated nuclear bodies*“, auch bekannt als „PML bodies“ oder „ND10“. Diese Strukturen werden von dem Matrixprotein PML gebildet und beinhalten zusätzliche Proteine wie z.B. Daxx oder Sp100, die u.a. als Transkriptionsrepressoren wirken können.

Eine funktionierende Interaktion zwischen IE3 und E1 ist zum Aufbau der Replikationskompartimente wichtig. So konnte für HCMV gezeigt werden, dass die Ausbildung der Kompartimente von IE2 ausgeht, dem HCMV-Homolog von IE3, welches an diesen Kernstrukturen lokalisiert ist. E1 Proteine lokalisieren mit IE3 bzw. IE2 und bauen durch Rekrutierung weiterer Faktoren die Kompartimente auf (Ahn et al. 1999). Durch die Aktivität von IE1 werden die ND10 Strukturen im Laufe der Infektion dann zerstört, wobei es zu einer diffusen Verteilung des PML-Proteins im Nukleus kommt. Die Zerstörung der ND10 Strukturen scheint von Vorteil für das Virus zu sein, da dieser Vorgang mit einer erhöhten Transkription in Verbindung gebracht werden konnte (Ahn und Hayward 1997, 2000, Tang und Maul 2003).

Dies wirft die Frage auf, wie sich eine Infektion spezie fremder Zellen auf die nukleären ND10 Strukturen auswirkt und ob es hierbei einen Unterschied zwischen einer Infektion mit MCMV/h und MCMV/wt gibt.

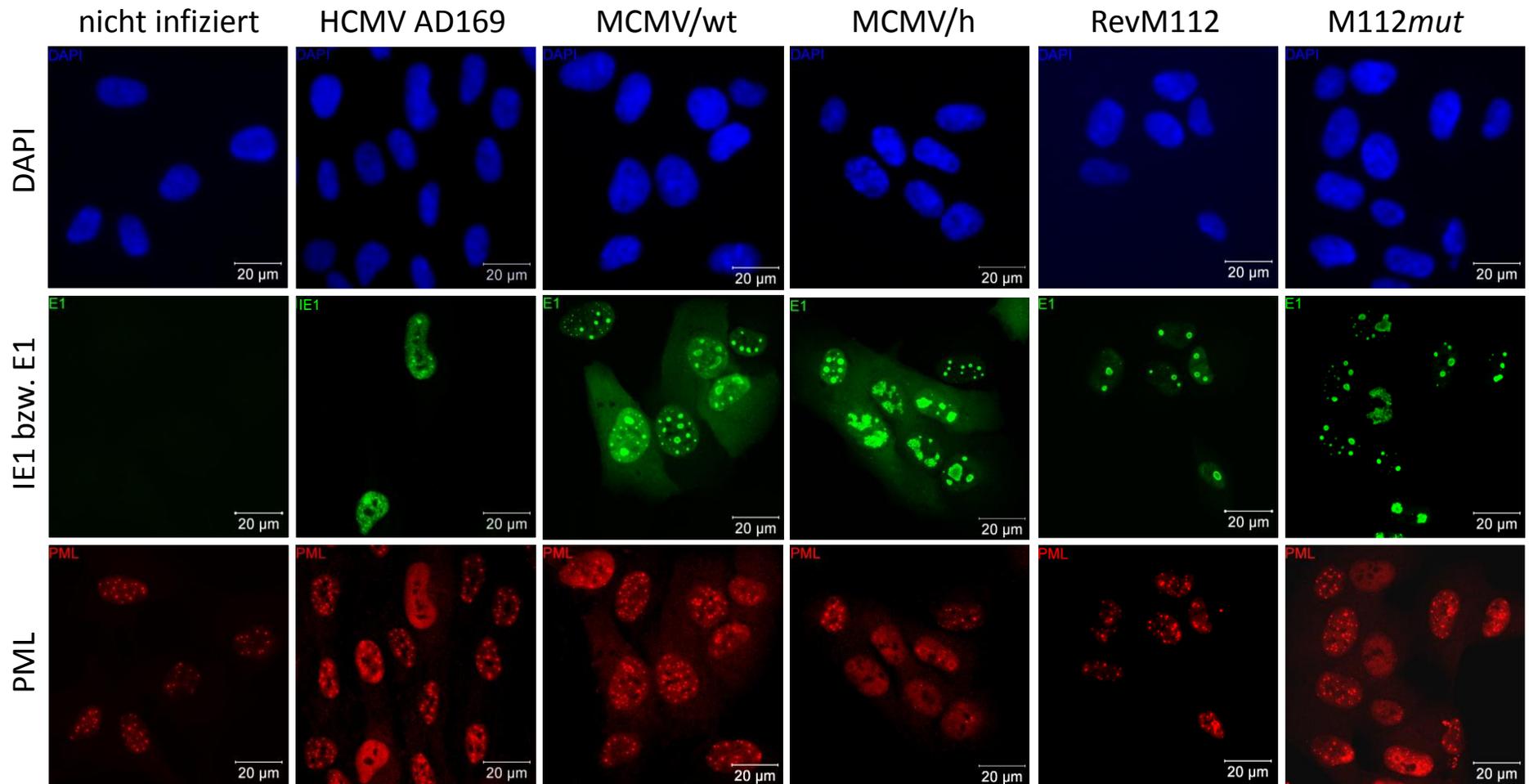
### **3.9 Einfluss der Replikation auf die ND10 Strukturen**

In permissiven Zellen ist die Zerstörung der ND10 Strukturen in der frühen Phase der Infektion ein wichtiger Schritt im viralen Replikationszyklus. Hierdurch können die dort lokalisierten Transkriptionsregulatoren ihre reprimierende Funktion nicht mehr ausüben und dies geht folglich mit einer verstärkten Transkriptionsrate viraler DNA einher (Ahn und

Hayward 1997, 2000, Tang und Maul 2003). In dieser so verstärkten Transkription ist ein deutlicher Vorteil für die Replikation des Virus zu sehen.

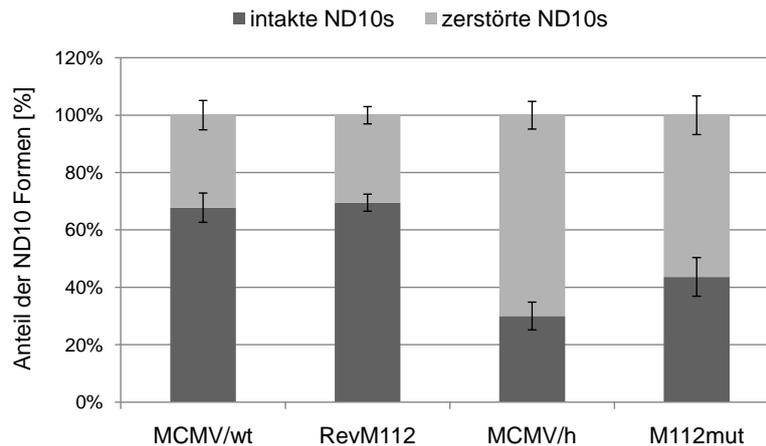
Um nun zu testen, ob es auch bei einer speziessfremden Infektion in humanen Zellen mit MCMV/wt und MCMV/h zu einer Zerstörung der ND10 kommt, wurden diese infiziert und die Zerstörung der Kernmikrostrukturen mittels Immunfluoreszenz analysiert. Da es bereits Hinweise gibt, dass die Zerstörung der ND10 durch IE1 nach einem speziesspezifischen Mechanismus erfolgt (Tang und Maul 2006), wurde als Positivkontrolle eine Infektion humaner Zellen mit HCMV vorgenommen. Zur Analyse der Dispersion der ND10 wurden die Zellen 24 h nach Infektion fixiert und für die Immunfluoreszenz genutzt. Dieser Zeitpunkt wurde ausgewählt, da beschrieben ist, dass eine MCMV-IE1-Deletionsmutante immer noch in der Lage ist, ND10 Strukturen zu zerstören, allerdings mit einer deutlichen Verzögerung. Deswegen zeigt diese Mutante erst 24 h nach Infektion eine mit dem Wildtyp vergleichbare Dispersionseffizienz (Ghazal et al. 2005). Um solche Verzögerungseffekte in den humanen Zellen auszuschließen, wurden die infizierten Zellen erst 24 h nach Infektion analysiert. Zu diesem Zeitpunkt konnte erwartet werden, dass die ND10 Strukturen auch tatsächlich zerstört sind, vorausgesetzt, dass eine Dispersion überhaupt stattfindet .

Wie in Abbildung 25 zu erkennen ist, führt eine Infektion humaner Zellen mit dem HCMV Stamm AD169 zu einer Dispersion der nukleären ND10 Strukturen im Vergleich zu uninfizierten Zellen. Deutlich erkennt man, dass das punktuerte Erscheinungsbild der ND10 Strukturen einer eher diffusen Verteilung über den Zellkern gewichen ist. In MCMV/wt und RevM112 infizierten humanen Zellen sieht man allerdings, dass die Mehrheit der Zellen noch deutliche ND10 Strukturen erkennen lassen bzw. dass es zu einer Aggregation/Umverteilung der ND10 zu kommen scheint (Abbildung 25). Dagegen sieht man deutlich, dass die Infektion von RPE-1 Zellen mit MCMV/h zu einer vermehrten Dispersion der ND10 Strukturen innerhalb des Zellkerns und zu einer diffusen Verteilung des PML-Proteins führt (Abbildung 25). In M112mut infizierten RPE-1 Zellen erkennt man, dass es zwar ebenfalls zur Auflösung der ND10 kommt, allerdings mit einer geringeren Effizienz als bei MCMV/h. Dementsprechend sind noch Zellen vorhanden, in denen die ND10 Strukturen intakt zu sein scheinen (Abbildung 25). Deutlich zeigt sich auch hier wieder die unterschiedliche Ausprägung der Replikationszentren nach Infektion der humanen Zellen mit den verschiedenen Viren (vgl. Abschnitt 3.7).



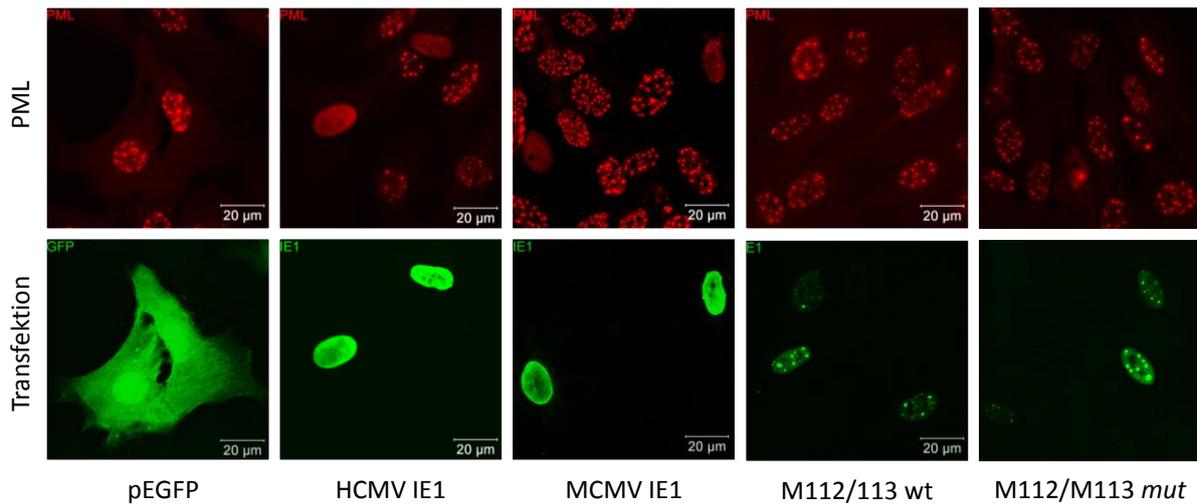
**Abbildung 25: Immunfluoreszenzfärbung humaner RPE-1 Zellen nach Infektion.** Die Zellen wurden mit einer MOI von 1 TCID<sub>50</sub>/Zelle für HCMV bzw. mit einer MOI von 3 TCID<sub>50</sub>/Zelle mit MCMV und dessen konstruierten Abkömmlinge infiziert und 24 h nach Infektion fixiert. HCMV infizierte Zellen wurden nach 48 h fixiert. Die Proteine PML und HCMV IE1 bzw. MCMV E1 wurden jeweils mit spezifischen Antikörpern angefärbt und als sekundäre Antikörper wurden solche verwendet, die mit Alexa488/grün- bzw. Alexa594/rot-gekoppelt waren. Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Die Signaldetektion erfolgte mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie.

Wie bei der Analyse der Immunfluoreszenzen zu erkennen ist, scheint die Zerstörung der ND10 kein Schwarz/Weiß-Effekt zu sein, d.h. eine Infektion mit MCMV/h oder M112*mut* muss nicht unbedingt zu einer Dispersion dieser Strukturen führen. Um diesen Effekt aber dennoch quantifizieren zu können, wurden erneut humane RPE-1 Zellen mit den verschiedenen Viren infiziert, mittels Immunfluoreszenz angefärbt und das Ausmaß der ND10 Zerstörung wurde in diesen infizierten Zellen mittels Auszählung bestimmt (Abbildung 26).



**Abbildung 26: Ergebnis der Auszählung humaner Zellkerne zur Bewertung der ND10 Zerstörung nach Infektion mit den angegebenen Viren.** Hierzu wurden RPE-1 Zellen mit einer MOI von 3 TCID<sub>50</sub>/Zelle infiziert, 24 h nach Infektion fixiert und die Proteine PML und E1 wurden mittels Immunfluoreszenz angefärbt. Anschließend wurden infizierte Zellkerne in Bezug auf Zerstörung der ND10 Strukturen bewertet und ausgezählt. Die Auszählung erfolgte in Triplikaten, wobei jeweils mindestens 150 infizierte Zellkerne bewertet wurden.

Wie in Abbildung 26 zu erkennen ist, und wie die Ergebnisse der Immunfluoreszenz zeigten, führt eine Infektion humaner Zellen mit MCMV/h zu einer deutlich stärkeren Zerstörung der ND10 Strukturen als dies nach einer Infektion mit MCMV/wt oder RevM112 der Fall ist. Infektionen mit M112*mut* führen zwar auch zu einer gesteigerten Zerstörung der nukleären ND10 Strukturen, allerdings mit einer geringeren Effizienz als bei MCMV/h (Abbildung 26). Um zu testen, ob die M112/113 Proteine bei der Zerstörung der ND10 eine direkte oder eher indirekte Rolle spielen, wurden die kodierenden Bereiche aus dem Plasmid pBluescript II KS<sup>+</sup> in das Expressionsplasmid pFlagCMV5a subkloniert und in humane RPE-1 Zellen transfiziert. 24 h nach Transfektion wurde eine Immunfluoreszenz durchgeführt. Durch Detektion des transfizierten plasmidcodierten Proteins und des zellulären PML-Proteins mit den jeweils spezifischen Antikörpern konnte der Einfluss auf die ND10 analysiert werden (Abbildung 27).

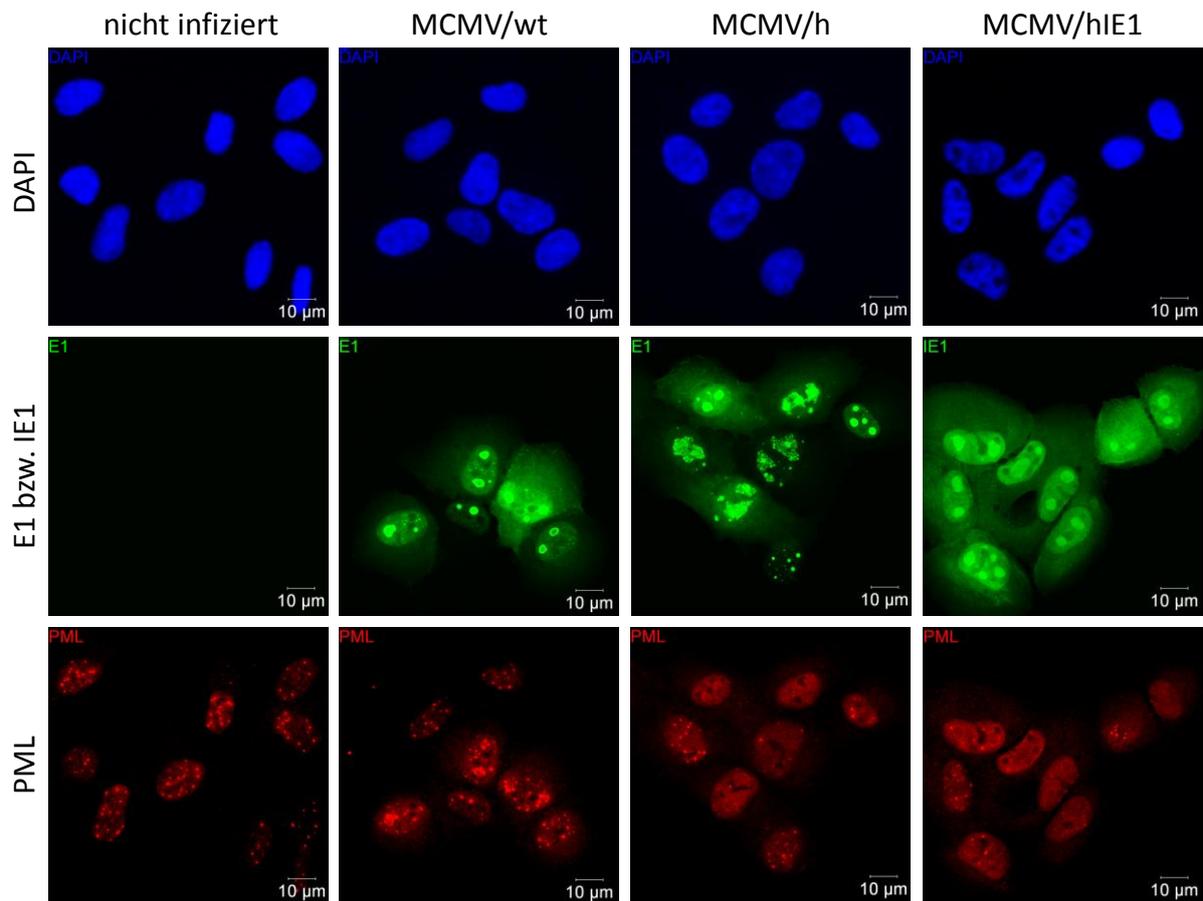


**Abbildung 27: Immunfluoreszenzfärbung transfizierter RPE-1 Zellen zur Analyse der ND10 Zerstörung.** Humane RPE-1 Zellen wurden mit Hilfe von Polyfect und den jeweiligen Plasmidkonstrukten transfiziert, die zur Expression des gewünschten Proteins führten. Die spezifischen Primärantikörper wurden mit Alexa488/grün- bzw. Alexa594/rot-gekoppelten Sekundärantikörpern detektiert und die Signale mit einem konfokalen Laserscanningmikroskop dokumentiert.

Wie die Immunfluoreszenzaufnahmen in Abbildung 27 zeigen, führt weder die Expression der Genregion M112/113wt noch die Expression von M112/113mut zu einer erkennbaren Dispersion der ND10 Strukturen in transfizierten Zellen. Auch die Expression des Kontrollproteins pEGFP hat keinen Einfluss auf die nukleären Strukturen. Dahingegen führt die Expression von HCMV IE1 und die Expression von MCMV IE1 in den humanen RPE-1 Zellen zu einer Zerstörung der ND10 Strukturen. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Dispersion der ND10 also nicht direkt durch die E1 Proteine verursacht wird. Eine indirekte Beteiligung, z.B. durch Ausbildung der Replikationskompartimente, wäre aber trotzdem noch vorstellbar. Die Zerstörung der ND10 wird in der Literatur bisher nur als Aktivität des IE1 Proteins beschrieben. Es muss hierfür aber auch weitere Mechanismen geben, da eine MCMV-IE1-Deletionsmutante (MCMV/ $\Delta$ IE1) zwar mit deutlicher Verzögerung, aber dennoch in der Lage ist, diese Strukturen zu zerstören (Ghazal et al. 2005).

Die bisherigen Ergebnisse lassen vermuten, dass die Zerstörung der ND10 bereits ausreichend sein könnte, um eine permissive Infektion in den spezie fremden humanen Zellen zu etablieren. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden humane RPE-1 Zellen mit einem modifizierten Virus infiziert, welches den codierenden Bereich des HCMV IE1 Proteins unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven Promoters im Genom trägt. Dieses murine CMV (MCMV/hIE1) ist somit in der Lage, nach Infektion der Zellen HCMV IE1 zu bilden und sollte deshalb die ND10 Strukturen zerstören können. Um die Zerstörung zu überprüfen, wurden nach Infektion humaner Zellen mit MCMV/hIE1 Immunfluoreszenzanalysen

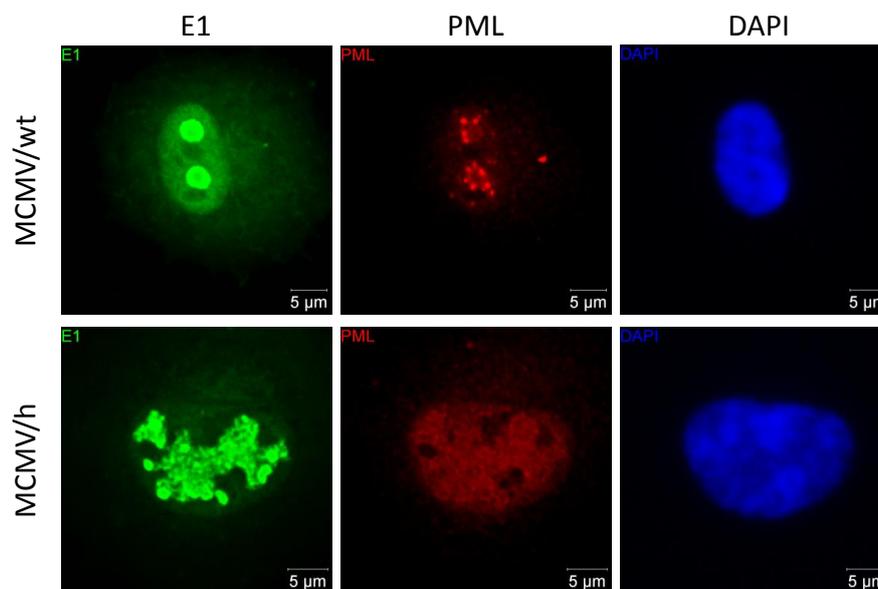
durchgeführt (Abbildung 28). Die Infektion humaner Zellen mit MCMV/hIE1 führt tatsächlich zu einer Zerstörung der nukleären ND10 Strukturen bzw. zu einer sehr starken Reduktion derselben im Vergleich zu uninfizierten RPE-1 Zellen (Abbildung 28). Der Phänotyp von MCMV/hIE1 erinnert somit sehr stark an den von MCMV/h bzw. AD169 (Abbildung 25).



**Abbildung 28: Immunfluoreszenzanalysen zur Untersuchung der ND10 Zerstörung nach Infektion mit MCMV/hIE1.** Humane RPE-1 Zellen wurden mit einer MOI von 3 TCID<sub>50</sub>/Zelle infiziert, 24 h nach Infektion fixiert und die Proteine PML und E1 bzw. hIE1 wurden mit spezifischen Antikörpern angefärbt. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Alle Bilder wurden mit einem konfokalen Laserscanningmikroskop aufgenommen.

Parallel wurde das Wachstum dieser Mutante in Infektionsstudien analysiert. Im Gegensatz zu MCMV/h ergaben diese allerdings, dass MCMV/hIE1 nicht in der Lage, ist in humanen Zellen eine permissive Infektion zu etablieren. Das heißt, dass die Zerstörung der ND10 zwar einen Vorteil in Bezug auf die Transkription bedeuten kann, dieser Effekt allerdings eher eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint, da MCMV/hIE1 sonst auch in der Lage wäre, in den humanen Zellen zu replizieren. Um in humanen Zellen eine permissive Infektion etablieren zu können, müssen also noch weitere Faktoren eine wichtige Rolle spielen.

Dass die Zerstörung der ND10 tatsächlich von Vorteil für MCMV/h zu sein scheint, lässt Abbildung 29 vermuten. Deutlich erkennt man nach einer Infektion mit MCMV/wt, dass sich die nicht zerstörten ND10 Strukturen an die Replikationskompartimente anlagern und diese umgeben. Da bei MCMV/h diese Strukturen weitestgehend zerstört wurden, findet dementsprechend auch keine Anlagerung statt (Abbildung 29). ND10 werden von dem Matrixprotein PML gebildet, für das gezeigt werden konnte, dass es selbst als Transkriptionsrepressor fungieren kann (Tavalai et al. 2006). Desweiteren sind innerhalb dieser Strukturen noch zusätzliche Proteine lokalisiert, die ebenfalls mit der Transkriptionsmaschinerie interagieren können und reprimierenden Charakter haben. Hier sei der prominente Vertreter Daxx stellvertretend genannt (Tavalai et al. 2008). Durch Anlagerung dieser nicht aufgelösten Strukturen können diese Proteine so möglicherweise negativ auf die Transkription innerhalb dieser Zentren wirken.



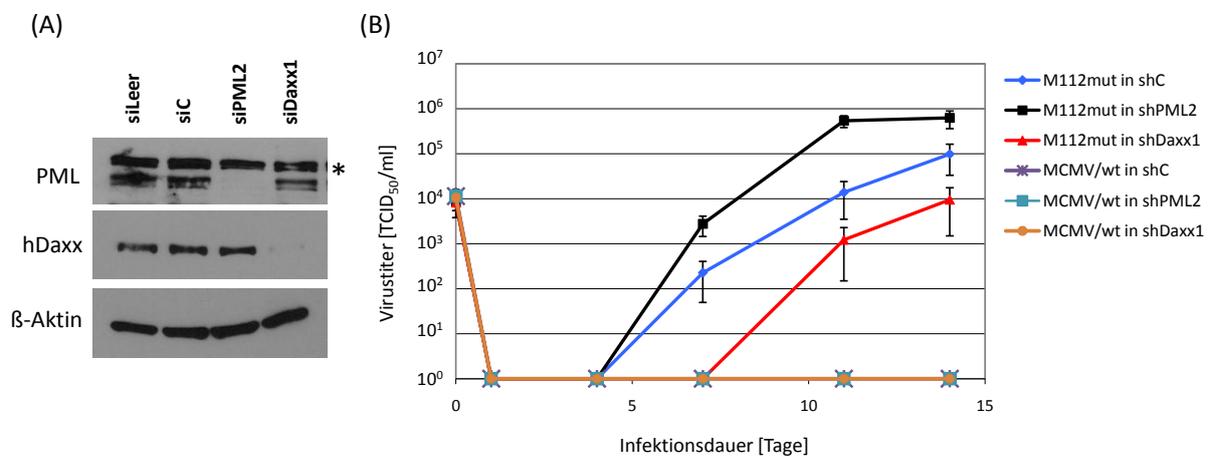
**Abbildung 29: Immunfluoreszenzaufnahme zum Nachweis der Anlagerung nicht zerstörter ND10 Strukturen an die gebildeten Replikationszentren auf Einzelzellebene.** RPE-1 Zellen wurden mit einer MOI von 3 TCID<sub>50</sub>/Zelle infiziert und 24 h nach Infektion fixiert. Wiederum wurden mit Hilfe einer Immunfluoreszenz die Proteine E1 und PML angefärbt und Alexa488/grün- bzw. Alexa594/rot-gekoppelte Sekundärantikörper verwendet. Der Zellkern wurde mit DAPI gefärbt und die Signale wurden mit einem konfokalen Laserscanningmikroskop detektiert.

### 3.10 Einfluss der ND10 Proteine PML und Daxx

In humanen Zellen konnte gezeigt werden, dass PML und Daxx einen negativen Effekt auf die Replikation von HCMV ausüben können, da ein siRNA vermittelter „knock-down“ dieser Proteine zu einem deutlichen Anstieg der viralen Replikation bzw. Genexpression führte (Tavalai et al. 2008, Tavalai et al. 2006, Woodhall et al. 2006). Diese Beobachtung

unterstützte somit die Frage, ob ein „knock-down“ der zellulären Proteine PML oder Daxx in speziessfremden humanen RPE-1 Zellen ebenfalls eine erhöhte Replikationsfähigkeit muriner Viren mit sich bringt.

Um dies zu testen, wurden stabile „knock-down“-RPE-1-Zelllinien generiert. Hierzu wurden RPE-1 Zellen mit Retroviren transduziert, deren Integration ins Genom zur Expression einer spezifischen shRNA gegen PML bzw. Daxx führten (Tavalai et al. 2006). Diese shRNA wird durch die intrazelluläre Prozessierung in die spezifische siRNA überführt. Nach Selektion der transduzierten Zellen konnte so ein stabiler „knock-down“ erreicht werden. Die Effizienz dieses „knock-downs“ wurde mittels Western Blot analysiert (Abbildung 30A).



**Abbildung 30: Untersuchung zum Einfluss eines shRNA "knock-downs" des zellulären PML- bzw. hDaxx-Proteins.** (A) Überprüfung der mittels retroviraler Transduktion hergestellten „knock-down“-RPE-1-Zelllinien 7 Tage nach Selektion mit Puromycin. Die Zellen wurden lysiert und das Zelllysate im Western Blot analysiert. Die mit \* markierte Bande stellt eine Hintergrundbande dar. (B) Wachstumsanalyse von MCMV/wt und M112mut in den generierten shRPE-1-, „knock-down“-Zellen. Diese wurden mit einer MOI von 0,2 TCID<sub>50</sub>/Zelle infiziert. Nach den jeweils angegebenen Tagen wurde die Virusmenge im Überstand mittels Titration bestimmt und ein Mediumwechsel vollzogen. (siLeer, Leervektor; siC, Kontrollvektor ohne funktionelle shRNA; siPML2, shRNA gegen PML; siDaxx1, shRNA gegen hDaxx).

Die hergestellten „knock down“-Zelllinien wurden für eine Wachstumsanalyse mit MCMV/wt und M112mut verwendet. M112mut ist in der Lage, in den humanen Zellen zu replizieren, allerdings mit geringerer Geschwindigkeit als MCMV/h. Wenn es analog zu HCMV durch den „knock down“ der zellulären Proteine PML oder Daxx einen Replikationsvorteil geben sollte, müsste dieser wohl am besten nach Infektion mit diesem Virus detektierbar sein.

Tatsächlich ließ sich ein bemerkenswerter Unterschied im Replikationsverhalten feststellen, wenn das zelluläre Protein PML durch die Expression der shRNA verringert wurde (Abbildung 30B). Deutlich zeigt sich ein initial stärkeres Wachstum, das nach ca. 11 Tagen in

einem Titer von ca.  $8 \times 10^5$  TCID/ml endet. Zu diesem Zeitpunkt liegt der Titer somit circa 1,5 log-Stufen höher, als bei einem Wachstum auf den Kontrollzellen, die mit einer nicht funktionellen shRNA transduziert wurden. In MCMV/wt infizierten shRPE-1-Zellen lässt sich dagegen keine Ausbreitung und kein Wachstum feststellen. PML übt also auch bei einer speziessfremden Infektion von MCMV in humanen Zellen eine reprimierende Wirkung aus. Ein „knock-down“ von PML ist also nicht ausreichend, um die Zellen permissiv für MCMV zu machen, was im Einklang mit den Experimenten mit der Mutante MCMV/hIE1 steht (vgl. Abschnitt 3.9).

Dahingegen scheint das Fehlen des zellulären Daxx Proteins einen negativen Effekt auf die Replikation ausüben. Deutlich erkennt man, dass die Replikation erst nach einer noch längeren Verzögerung startet und im Vergleich zum PML-„knock down“ an Tag 14 einen fast zwei log-Stufen niedrigeren Titer aufweist (Abbildung 30B). Tatsächlich wurde erwartet, dass ein Daxx-„knock-down“ ebenfalls zu einer stärkeren Replikation führt und somit war dieses Ergebnis überraschend. Wie lässt es sich aber erklären? Es gibt Hinweise darauf, dass durch das Fehlen des zellulären Daxx-Proteins eine stärkere Sensitivität gegenüber apoptotischen Signalen verursacht wird, da Daxx u.a. an der Repression proapoptotischer Gene beteiligt ist (Chen und Chen 2003, Croxton et al. 2006). Da bei einer Infektion humaner Zellen mit MCMV Apoptose ausgelöst wird (Jurak und Brune 2006), könnte es somit zu einer Verstärkung des Effektes kommen und es sterben mehr infizierte Zellen als normal üblich. Das bedeutet auch, dass zu Beginn der Infektion weniger Zellen infiziert sind und folglich dauert es länger, bis Virus im Überstand detektierbar wird.

## 4 Diskussion

### 4.1 Zytomegalieviren: Infektionen und Adaptation an neue Wirtsorganismen

Zytomegalieviren gehören zur Familie der  $\beta$ -*Herpesvirinae*, die als strikt speziesspezifisch angesehen werden (Mocarski et al. 2007, Modrow et al. 2003). Das heißt, dass eine permissive Infektion nur in Zellen der eigenen oder nah verwandten Arten etabliert werden kann. Auch in anderen Virusfamilien gibt es diese Spezies-Spezifität so z.B. bei der Familie der Pockenviren, zu denen u.a. die Kuhpocken oder auch das Mxomavirus zählen (McFadden 2005, Wang F. et al. 2004). Es gibt einige Beispiele aus jüngerer Vergangenheit, bei denen es durch adaptive Vorgänge innerhalb einer Virusart zu neuartigen speziesspezifischen Infektionen mit weltweiten Epidemien kam z.B. HIV (Sauter et al. 2009) und Influenza H1N1 (Taubenberger et al. 2005). Bei diesen handelte es sich ursprünglich um Affenviren (HIV) bzw. um Vogelviren (H1N1), die aber durch genetische Veränderungen die Fähigkeit erlangt haben, in speziessfremden humanen Zellen permissiv zu replizieren (vgl. Abschnitt 1.6).

Eine Wirtserweiterung konnte auch im Falle von MCMV/h *in vitro* beobachtet werden. Dieses spontan adaptierte Virus basiert auf MCMV/wt, hat allerdings durch Mutationen die Fähigkeit erlangt, in speziessfremden humanen Zellen eine permissive Infektion etablieren und Virusnachkommen bilden zu können. Tatsächlich wurde bereits eine solche speziesspezifische Adaptation von MCMV/wt an humane Zellen *in vitro* von Raynaud und Kollegen beschrieben (Raynaud et al. 1969). Diese arbeiteten mit einem Zytomegalievirus, das aus der Feldmaus *Apodemus sylvaticus* isoliert wurde. Sie sahen nach Passagierung des Virus in Hamsterzellen eine Adaptation an humane diploide Zellen und an Affenzellen (Raynaud et al. 1969). Diese Adaptationsbeschreibung ist umso interessanter, da das adaptierte Virus in den Affenzellen ein Titer von ca.  $1 \times 10^7$  erreicht haben soll. Dies entspricht ebenfalls dem Titer von MCMV/h in den humanen RPE-1 Zellen in dieser Arbeit (Abbildung 7). In einer späteren Studie wurde der eben beschriebene MCMV-Raynaud-Stamm vor der Adaptation mit dem MCMV-Smith-Stamm in Bezug auf Replikationsverhalten, Morphologie der Plaques, Viruspartikeldichte und Antikörper-Kreuzreaktivität verglichen (Kim et al. 1974). Hierbei stellte sich heraus, dass sich die beiden MCMV-Stämme in den getesteten Parametern kaum voneinander unterschieden. Kim und Kollegen schlossen daraus, dass sich im MCMV-Raynaud-Stamm während des Adaptationsvorganges bemerkenswerte Veränderungen vollzogen haben oder dass es sich bei dem passagierten Virus um eine Kontamination handelte (Kim et al. 1974). Leider wurden diese Beobachtungen vor der Etablierung molekulargenetischer Methoden wie z.B. der Sanger-Sequenzierung gemacht.

Mit Hilfe der Molekularbiologie könnte man leicht herausfinden, ob Adaptationen in dem Raynaud-Stamm stattgefunden haben, und wenn ja, welche oder ob es sich letztlich doch nur um eine Kontamination mit einer anderen Virusspezies handelte. Trotz allem, ist die hier geschilderte frühe Beobachtung adaptiver Vorgänge bei MCMV sehr interessant, da solche Vorgänge auch im Zuge der hier vorgestellten Experimente beobachtet wurden.

Eine Wirtserweiterung kann durch eine genetische Reassortierung oder durch Rekombinationsereignisse erfolgen. Sie kann aber auch im einfachsten Fall durch Punktmutationen verursacht werden, durch die z.B. eine verbesserte Protein-Rezeptor-Bindung in der fremden Spezies entsteht (Parrish et al. 2008). Punktmutationen werden durch fehlerhafte Vorgänge bei der DNA-Replikation durch die DNA-Polymerase eingebaut, die die neuen DNA-Stränge synthetisiert. Im Falle der Herpesviren wird geschätzt, dass synonyme und nicht-synonyme Basensubstitutionen mit einer Häufigkeit von  $1 \times 10^{-7}$  bis  $2,9 \times 10^{-9}$  pro Nukleotid pro Jahr anzutreffen sind (Umene und Sakaoka 1999). Im Laufe der Zeit können sich deshalb Mutationen ansammeln, die unter gewissen Umständen oder unter Selektionsdruck einen Replikationsvorteil bieten können und so zu einer Selektionierung der besser angepassten Viren führen. Diese Selektion scheint auch bei MCMV/h stattgefunden zu haben. Tatsächlich konnten verschiedene Mutationen detektiert werden, die nur in MCMV/h zu finden sind und nicht im parentalen MCMV/wt. Trotzdem zeigte der Einbau der bisher detektierten Mutationen, alleine oder in Kombination, dass nur die Mutationen im Genbereich M112/113 einen ähnlichen Phänotyp verursachen wie er auch in MCMV/h nach Infektion humaner Zellen zu finden ist. Da diese Mutante M112*mut* aber ein verzögertes Wachstum zeigt, liegt es nahe, dass es noch weitere Mutationen geben muss, die den Phänotyp von MCMV/h begünstigen bzw. mitverursachen.

#### **4.2 Apoptoseinduktion von MCMV in humanen Zellen**

Unter Apoptose versteht man die Ausführung des programmierten Zelltodes nach einem feststehenden Ablauf. Dieser Prozess dient z.B. dazu, entartete Krebszellen oder aber auch virusinfizierte Zellen zu eliminieren, um so den Gesamtorganismus vor diesen schädlichen Einflüssen zu schützen. Da Zytomegalieviren einen relativ langen Replikationszyklus haben (zwischen 24 und 48 h), mussten sie im Laufe der Evolution Maßnahmen entwickeln, um zellulären Abwehrmechanismen wie z.B. der Induktion der Apoptose entgegenzuwirken. Für eine Reihe von Genen sowohl in HCMV (u.a. UL37x1, UL38, UL36) als auch in MCMV (u.a. M36, m38.5, m41.1, M45) konnte bisher gezeigt werden, dass deren Genprodukte antiapoptotische Funktionen haben und durch Wechselwirkung mit proapoptotischen Proteinen (z.B. Bax/Bak) den Ablauf der Apoptose modifizieren oder blockieren können

(Çam et al. 2009, Goldmacher et al. 1999, Jurak et al. 2008, Mack et al. 2008, Ménard et al. 2003, Skaletskaya et al. 2001, Xuan et al. 2009).

Kommt es zu einer Infektion humaner Zellen mit MCMV wird u.a. Apoptose ausgelöst. Die Zelle stirbt und es kann keine Virusreplikation stattfinden (Jurak und Brune 2006). Unterdrückt man allerdings die Apoptose durch Überexpression antiapoptotischer Proteine wie z.B. BclX<sub>L</sub> oder UL37x1, kann das murine Zytomegalievirus auch in artfremden humanen Zellen replizieren und Virusnachkommen bilden, wenn auch mit eingeschränkter Effizienz (Jurak und Brune 2006). Im Falle einer MCMV/h Infektion konnte mit verschiedenen Methoden gezeigt werden, dass die Apoptose zwar ebenfalls induziert wird, diese aber mit einer geringeren Effizienz und mit einer zeitlichen Verzögerung abläuft (Abbildung 6). Diese Verzögerung bietet dem adaptierten Virus zusätzlich Zeit, den Replikationszyklus zu durchlaufen, bevor durch die ausgelöste Apoptose eine Degradation der zellulären und viralen DNA und ein Stopp der Proteinbiosynthese erfolgt.

Leider gibt es kaum genauere Untersuchungen darüber, ob die bisher beschriebenen antiapoptotischen Proteine von MCMV auch in humanen Zellen funktionell sind. So wurde gezeigt, dass die Expression des murinen Gens M45 nach Transfektion in humane HeLa Zellen, diese nicht vor einem rezeptorvermittelten (Fas-Rezeptor) Zelltod schützen kann (Goldmacher 2005). Ähnlich verhält es sich mit dem murinen m38.5 Protein, dem Bax-spezifischen Inhibitor in murinen Zellen. Zwar wurde ebenfalls mit transients Expression in humanen Fibroblasten und HeLa Zellen gezeigt, dass diese durch die Expression von m38.5 vor einer Proteasom-Inhibitor-induzierten Apoptose geschützt sind, aber andererseits wurden die Zellen nicht vor einer Fas-Rezeptor induzierten Apoptose geschützt, obwohl das Protein mit homologer Funktion aus HCMV UL37x1 diesen Schutz alleine vermittelte (McCormick et al. 2005). Auch die transiente Expression des MCMV Gens m41.1 in HeLa Zellen, dem Bak-spezifischen Inhibitor in murinen Zellen, alleine oder in Kombination mit m38.5, schützten die humanen Zellen nicht vor einer Fas-vermittelten Apoptose (Dissertation Çam 2009). Werden beide Proteine allerdings simultan in murinen Zellen exprimiert, sind diese somit im Gegensatz zu den humanen Zellen vor einer Fas-induzierter Apoptose geschützt (Çam et al. 2009). In murinen Zellen können die Proteine M45, m38.5 und m41.1 ihre antiapoptotischen Funktionen wahrnehmen, wirken dort als spezifische Inhibitoren bzw. Modulatoren der über extrinsische und/oder intrinsische Signale induzierten Apoptose (Çam et al. 2009, Jurak et al. 2008, Mack et al. 2008) und sind so für eine effiziente Replikation von großer Bedeutung.

Diese drei Beispiele belegen, dass die antiapoptotischen Proteine speziell an die Signalwege der jeweiligen Wirtsspezies angepasst zu sein scheinen und dass diese in Zellen einer anderen Art mitunter nicht ihre komplette modulierende Funktion erfüllen können, was mit einer ineffizienten Infektion bzw. Replikation einhergeht. Dieser Sachverhalt kann deshalb als eine wichtige Ursache der Spezies-Spezifität angesehen werden und zeigt erneut, wie wichtig eine Modulation der Wirtszellbedingungen für die Replikation von CMV ist.

Tatsächlich wurden aber in MCMV/h in keinem der bisher bekannten antiapoptotischen Gene Mutationen gefunden, die auf eine mögliche Adaptation des inhibitorischen Signalweges der Apoptose in artfremden Zellen hindeuten würden. Die konstruierte Mutante M112*mut*, die alle detektierten Mutationen im Genbereich M112/113 trägt, zeigt aber ebenfalls eine schwächere Apoptoseinduktion im Vergleich zu MCMV/wt, aber dennoch eine stärkere Induktion bezogen auf MCMV/h (Abbildung 14). Dies würde den Schluss nahe legen, dass die Proteine der M112/113 Region eventuell in den apoptotischen Signalweg eingreifen. Allerdings konnten die Proteine oder auch nur eine bestimmte Isoform der 112/113 Genregion weder bei MCMV noch bei HCMV mit Induktion oder Inhibition des apoptotischen Signalweges in Verbindung gebracht werden. Verschiedene Studien belegten lediglich, dass diese Proteine für die DNA-Replikation relevant sind (Ahn et al. 1999, Iwayama et al. 1994). Es ist daher eher unwahrscheinlich, dass durch die Mutationen in M112/113 zusätzliche Funktionen entstanden sind, die den apoptotischen Signalweg manipulieren können. Hinzu kommt, dass die M112/113 Proteine im Kern lokalisiert sind (Abbildung 22) und die bei der Induktion und Ausführung der Apoptose beteiligten Proteine hingegen im Cytoplasma. Diese unterschiedliche Verteilung würde eine Interaktion sehr erschweren.

Wie lässt sich dann aber die schwächere Induktion der Apoptose in den artfremden Zellen erklären? Hierzu können nur Vermutungen angestellt werden, da keine konkreten Daten vorliegen. Allerdings ist auffällig, dass Viren mit mutierter M112/113 Genregion ebenfalls die Eigenschaft haben, nicht nur weniger Apoptose auszulösen, sondern auch mit einer erhöhten Frequenz die nukleären ND10 Strukturen zerstören, wobei dies nach Infektion humaner Zellen mit M112*mut* ebenfalls mit einer geringeren Effizienz erfolgt (Abbildung 25 und Abschnitt 4.4). Eine Verbindung von ND10 und Apoptose konnte durch die Beobachtung gemacht werden, dass *pml*-„knock-out“ Zellen enorme Defekte bei der Verarbeitung apoptotischer Signale aufweisen (Bernardi und Pandolfi 2003). Verschiedene Studien belegen, dass die ND10 Strukturen sowohl bei der extrinsischen rezeptorvermittelten Apoptose als auch bei der intrinsisch induzierten Apoptose wichtig sind und hierbei insbesondere auch das Tumorsuppressorgen p53 eine zentrale Rolle spielt. Das p53 Protein

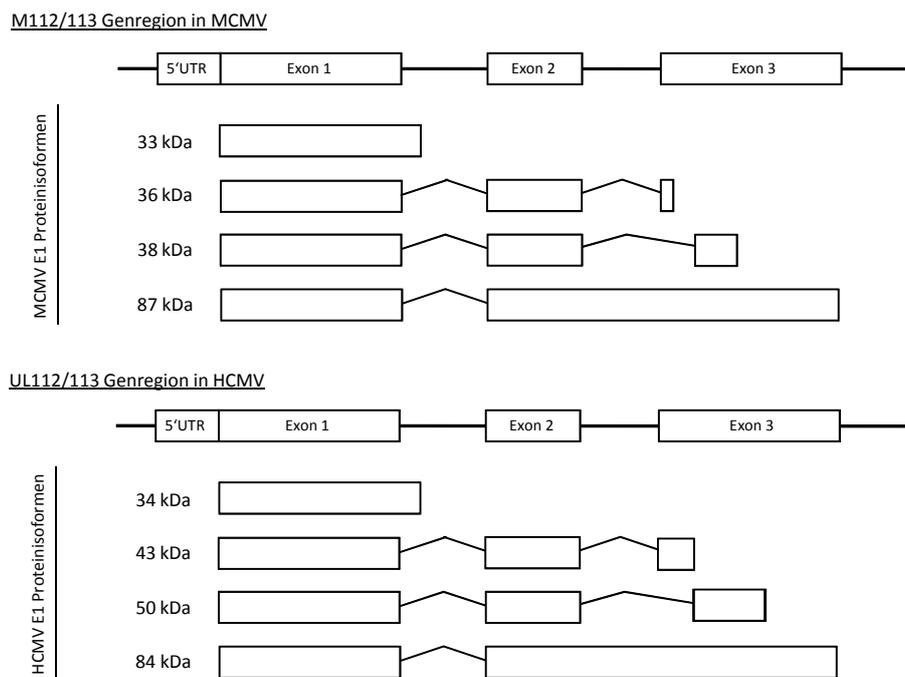
kann zu den ND10 rekrutiert werden, wo es durch andere Proteine acetyliert bzw. phosphoryliert werden kann, somit in der Funktion modifiziert wird und über weitere Signalwege wiederum Apoptose auslösen kann (Hofmann und Will 2003). Viele andere Proteine sind bisher beschrieben worden, die ebenfalls in den ND10 lokalisiert sind oder nach Aktivierung der apoptotischen Signale dorthin rekrutiert werden können und letztlich über komplexe Wechselwirkungen mit weiteren Proteinen Apoptose induzieren. Hierzu gehören auch die Proteine der „DNA-damage response“, die DNA-Schäden erkennen und einen Zellyklusarrest verursachen können (Bernardi und Pandolfi 2007, Krieghoff-Henning und Hofmann 2008). Da MCMV/h und MCMV/wt die nukleären ND10 Strukturen in humanen Zellen unterschiedlich stark zerstören, wäre es vorstellbar, dass es hierdurch auch zu einer unterschiedlichen Modulation der ND10-vermittelten apoptotischen Signale kommt. Hierdurch könnte MCMV/h einen Vorteil haben, so dass weniger stark bzw. mit Verzögerung Apoptose induziert wird. Diese zeitliche Verzögerung erleichtert somit den Ablauf des Replikationszyklus und es können Viruspartikel gebildet werden. Um diese Vermutung zu bestätigen, sind allerdings nähere Untersuchungen der erläuterten Signalwege von Nöten.

### **4.3 DNA-Replikation von MCMV/h in humanen Zellen**

In MCMV/h konnten verschiedene Mutationen gefunden werden, die nicht in MCMV/wt anzutreffen sind. Diese umfassten große und kleine Deletionen, eine große Duplikation und verschiedene Punktmutationen, die sowohl in ORFs mit bekannter als auch unbekannter Funktion liegen und auch in intergenischen Regionen detektiert werden konnten (Tabelle 3). Durch zielgerichtete BAC-Mutagenesen wurden diese Mutationen in den MCMV/wt-BAC eingebaut. Nach Rekonstitution der mutierten Viren wurden Infektionen mit humanen RPE-1 Zellen durchgeführt. Hierbei stellte sich heraus, dass die Mutationen in M112/113 einen deutlichen Einfluss auf das Wachstum in humanen Zellen haben. Es konnte ein Wachstum der M112<sub>mut</sub> Mutante detektiert werden, allerdings mit einer Verzögerung und einem geringeren Titer im Vergleich zu MCMV/h (Abbildung 14).

Die Genregion M112/113 in MCMV stellt die homologe Genregion zu UL112/113 von HCMV dar (Abbildung 31). Beide zeigen einen sehr ähnlichen Aufbau und kodieren durch alternative Spleißvorgänge vier verschiedene Proteinisoformen (Ciocco-Schmitt et al. 2002). Diese sind im Falle von HCMV 34, 43, 50 und 84 kDa groß (Wright und Spector 1989) und bei MCMV 33, 36, 38 und 87 kDa groß (Ciocco-Schmitt et al. 2002). Zusätzlich können diese Isoformen durch Phosphorylierung posttranslational modifiziert werden, was zu einer Abweichung vom theoretisch vorhergesagten Molekulargewicht führt (Bühler et al. 1990, Wright und Spector 1989). Die Expression der Proteine der Genregion 112/113 erfolgt mit

einer E-Kinetik, also kurze Zeit nach der Infektion und nach dem Start der Expression der IE Gene (Abbildung 8), wobei die Genprodukte IE3 bei MCMV und IE2 bei HCMV für die Expression benötigt werden (Angulo et al. 2000, Marchini et al. 2001). Obwohl die E1 Proteine vor langer Zeit erstmals beschrieben wurden, weiß man relativ wenig über deren genaue Funktion oder über die Funktion der einzelnen Proteinisoformen. Bekannt ist, dass die Genprodukte der E1 Region, zusammen mit den IE Proteinen, die Expression andere Gene positiv beeinflussen. Hierbei handelt es sich insbesondere um solche, die an der DNA-Replikation beteiligt sind u.a. das Gen der DNA-Polymerase (UL54) und das Gen, das die Untereinheiten des Helikase/Primase-Komplexes kodiert (Iskenderian et al. 1996, Kerry et al. 1996). Außerdem besitzen die 112/113 Proteine DNA-Bindeigenschaften (Iwayama et al. 1994) und lokalisieren zusammen mit IE3 bzw. IE2 in der Nähe der ND10 (Ahn et al. 1999, Tang et al. 2005).



**Abbildung 31: Schematischer Aufbau der HCMV und MCMV Genregion 112/113 (nach Ciocco-Schmitt et al. 2002).** Dargestellt sind jeweils die 4 verschiedenen Proteinisoformen und deren codierende Bereiche im Genom. Der Aufbau und das Spleiß-Muster dieser Genregion sind insgesamt sehr ähnlich.

Ausgehend von der frühen Kolo-kalisation zwischen den 112/113 Proteinen und IE2 in HCMV bzw. IE3 in MCMV werden die DNA-Replikationskompartimente aufgebaut, die anfangs klein sind, dann aber mit fortschreitender Infektionsdauer an Größe gewinnen und letztlich ein „wolkiges“ Erscheinungsbild haben und fast den ganzen Nukleus ausfüllen (Ahn et al. 1999, Penfold und Mocarski 1997, Qian et al. 2008). In diesen Kompartimenten befinden sich

neben der viralen DNA auch wichtige Proteine der DNA-Replikation u.a. die DNA-Polymerase-Untereinheit M44/UL44 und das DNA-Einzelstrangbindeprotein UL57 (Ahn et al. 1999, Tang et al. 2005). Da weitere Proteine für eine effiziente DNA-Replikation benötigt werden, z.B. die DNA-Helikase bzw. Polymerase, ist anzunehmen, dass diese in den Zentren ebenfalls zu finden sind (Pari und Anders 1993). Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass der Zusammenbau dieser Kompartimente durch die Expression der 112/113 Proteine gesteuert wird (Ahn et al. 1999, Penfold und Mocarski 1997). Dass es sich bei diesen Zentren tatsächlich um DNA-Replikationskompartimente handelt, wurde durch den Einbau des Thymidin-Analogons Bromdesoxyuridin nachgewiesen, das in neu synthetisierte DNA eingebaut wird und mittels Immunfluoreszenz detektiert werden kann (Ahn et al. 1999). Die Proteine der 112/113 Genregion in HCMV und MCMV zeigen am N-Terminus (Exon 1) eine recht hohe Konservierung der Aminosäuresequenz, sind sich aber sonst recht unähnlich (Park et al. 2006). Es wurde gezeigt, dass die verschiedenen Isoformen über den gemeinsamen N-Terminus miteinander interagieren können und so in der Lage sind, die Kompartimente im Kern zu bilden (Park et al. 2006).

Die gefundenen Mutationen im Genbereich M112/113 in MCMV/h befinden sich in Exon 1 und Intron 2 (Abbildung 12). Dementsprechend sind nicht alle E1 Proteinisoformen gleichmäßig von den Mutationen betroffen. Die Deletion des Aminosäuremotives  $\Delta$ GSP betrifft alle Isoformen, da diese in Exon 1 liegt, welches in allen E1 Proteinen zu finden ist. Die beiden anderen Mutationen liegen im Intron 2, das zum kodierenden Bereich der großen 87 kDa Isoform gehört und somit als Exon für diese zu bezeichnen ist (Abbildung 12). Der Kerntransport der HCMV UL112/113 Proteine erfolgt über die in Exon 2 liegende Kernlokalisationssequenz (Li et al. 1999, Park et al. 2006). Es ist also anzunehmen, dass sich in den homologen MCMV M112/113 Proteinen ebenfalls eine solche Lokalisationssequenz im Exon 2 befindet. Tatsächlich zeigte sich auch kein Unterschied in der nukleären Lokalisation der mutierten E1 Proteine im Vergleich zu den nicht-mutierten Proteinen nach Infektion humaner Zellen (Abbildung 22). Der Proteintransport in den Kern erfolgt also speziesunabhängig auch in humanen Zellen und die Kernlokalisierung dieser Proteine wird durch die verschiedenen Mutationen nicht beeinflusst. Da in M112/113 Exon 2 auch keine Mutationen vorhanden waren, wurde ein Einfluss auf den Kerntransport auch nicht erwartet.

Beim Zusammenbau der Replikationskompartimente war auffällig, dass Viren mit mutierter M112/113 Genregion mit einer deutlich höheren Effizienz große, singuläre und kernfüllende Kompartimente bildeten, als Viren mit wt M112/113 Genregion, die vermehrt kleine, runde

und meist auch mehrere Kompartimente bildeten (Abbildung 23). Die Mutationen in M112/113 scheinen also einen deutlichen Vorteil beim Aufbau dieser DNA-Replikationszentren in den humanen Zellen zu bieten. Die Deletion  $\Delta$ GSP befindet sich in der N-terminalen Region und betrifft alle vier Isoformen. Diese Region ist wichtig zur Interaktion der einzelnen Isoformen miteinander (Park et al. 2006) und es kann vermutet werden, dass die Deletion eine verbesserte Wechselwirkung der Proteinisoformen in den humanen Zellen zulässt, wodurch der Aufbau der Replikationszentren effizienter wird. Diese Tatsache könnte somit auch die Grundlage der stärkeren DNA-Replikation von MCMV/h in den humanen Zellen darstellen (Abbildung 9).

Es ist sehr wahrscheinlich, dass die verschiedenen Isoformen bei dem Aufbau der Zentren unterschiedliche Funktionen wahrnehmen, insbesondere was die Rekrutierung der benötigten Faktoren zur DNA-Replikation angeht. Allerdings liegen über die Aufgaben der verschiedenen Isoformen der 112/113 Genregion kaum Daten vor. Es ist lediglich bekannt, dass die Rekrutierung des DNA-Polymerase Ko-Faktors UL44 in HCMV durch die Aktivität der E1 Proteine bewerkstelligt wird. Diese Rekrutierung ist am stärksten, wenn alle Isoformen exprimiert werden (Park et al. 2006). Insbesondere die 84 kDa Isoform scheint hierbei eine besondere Rolle zu spielen, da dieses Protein die Rekrutierung von UL44 in die Zentren deutlich verstärkt (Park et al. 2006). Diese Beobachtung ist von großem Interesse, da durch zielgerichtete BAC-Mutagenesen gezeigt werden konnte, dass die beiden Punktmutationen in der großen 87 kDa Isoform in M112/113 ausreichend sind, um die Replikation von MCMV in den artfremden humanen Zellen zu unterstützen (Abbildung 19). Es könnte also sein, dass durch die Mutation der großen Isoform eine verbesserte Rekrutierung von M44 in die Replikationszentren erfolgt. Dies setzt natürlich voraus, dass die Rekrutierung mechanistisch ähnlich ist wie in HCMV. Allerdings lies sich eine stärkere Rekrutierung bei den durchgeführten Immunfluoreszenzuntersuchungen zum Aufbau der Kompartimente nicht bestätigen bzw. dürfte mit dieser Methode nur schwer zu detektieren sein, insbesondere wenn es sich hierbei um einen schwächeren Effekt handelt (Abbildung 24). Nichtsdestotrotz wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass sogar bei einer MCMV/wt Infektion in humanen Zellen der Zusammenbau der DNA-Replikationszentren, insbesondere die Rekrutierung des DNA-Polymerase Ko-Faktors M44 funktioniert und dass diese Zentren sich lediglich in der Größe und Anzahl von Viren mit mutierter M112/113 Genregion unterscheiden (Abbildung 23). Dies belegt, dass MCMV/wt ebenfalls in der Lage ist, eine DNA-Replikation in humanen Zellen zu durchlaufen, allerdings mit einer geringeren Effizienz als MCMV/h und diese

schwächere Replikation konnte auch experimentell durch RealTime-PCR- und „Slot Blot“-Analysen bestätigt werden (Abbildung 9).

Mittels Western Blot Analysen konnte gezeigt werden, dass die große 87 kDa Isoform bei MCMV/h und M112*mut* zu späten Infektionszeitpunkten noch vorhanden war, im Gegensatz zu MCMV/wt und RevM112 (Abbildung 20). Diese Beobachtung könnte mit einer verbesserten Proteinstabilität der 87 kDa Isoform erklärt werden, die durch die beiden Aminosäureaustausche verursacht wird. Denkbar wäre aber auch, dass die beiden Punktmutationen einen Einfluss auf das Spleiß-Muster der Genregion M112/113 ausüben und es so zu einer Verschiebung der Expression der Isoformen zu späten Zeitpunkten kommt. Wie dem auch sei, ist das Vorhandensein der 87 kDa Isoform wiederum als klarer Vorteil für die Replikation zu sehen. Alle benötigten Isoformen zur Aufrechterhaltung der Kompartimentbildung sind vorhanden und deshalb können auch zu späten Zeitpunkten die benötigten Replikationsproteine durch das Zusammenspiel aller Isoformen noch rekrutiert werden, wodurch wiederum eine effiziente Replikation gewährleistet werden kann.

In einer neueren Arbeit von Tang und Kollegen wurde beschrieben, dass die große 87 kDa Isoform von M112/113 mit IE3 interagiert und so den reprimierenden Effekt dieses Proteins auf den „major immediate early promoter“ (MIEP) verhindert. Die Aktivität dieses Promoters wird für die Synthese von IE1/IE3 benötigt, die wiederum die Expression von M112/113 aktivieren (Tang et al. 2005). In den hier durchgeführten Expressionsanalysen ließ sich allerdings keinerlei Einfluss auf die Expression von IE1 oder IE3 feststellen, egal ob die 87 kDa Isoform vorhanden war oder fehlte (Abbildung 20). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die Mutationen in der großen Isoform keinen oder nur einen sehr geringen Einfluss auf die Wechselwirkung mit IE3 haben. Der fehlende Nachweis des negativen Einflusses von IE3 auf den MIEP, wie von Tang und Kollegen postuliert, könnte dadurch erklärbar sein, dass die Repression durch IE3 in den humanen Zellen vernachlässigbar gering ist oder dass der repressive Charakter zu späten Zeitpunkten keine Rolle mehr spielt.

#### **4.4 Rolle der ND10 in der speziesfremden Infektion**

„Promyelocytic leukaemia protein nuclear domains“, kurz „PML-bodies“ oder „ND10“, sind in den Zellkernen der meisten Säugetierzellen zu finden und besitzen eine Größe von 0,2 - 1 µm. Diese ND10 bestehen aus dem Matrixprotein PML und weiterer assoziierter Proteine. Von denen sind einige nur transient nach Stimulation dort lokalisiert, andere aber auch konstitutiv. Hierzu gehören u.a. die Proteine Daxx und Sp100 (Negorev und Maul 2001). Die Anzahl der ND10 Strukturen pro Zelle variiert zwischen 1 - 30 und ist z.B. Zelltyp- und

Zellzyklusphasen-abhängig. Strukturell und funktionell stellen sie sehr heterogene Strukturen dar und nehmen innerhalb der Zelle verschiedenste regulatorische Aufgaben wahr. Sie sind z.B. an Vorgängen wie der Apoptose- und Transkriptionsregulation oder aber auch an bestimmten Proteinmodifikationen beteiligt (Bernardi und Pandolfi 2007). Desweiteren können diese Strukturen die Replikation vieler verschiedener Viren beeinflussen u.a. auch die Replikation von Herpesviren, deren Genome sich nach Infektion und Transport in den Kern in der Nähe der ND10 Strukturen anlagern (Ishov und Maul 1996). ND10 spielen deshalb auch eine wichtige Rolle bei der intrinsischen Abwehr von Virusinfektionen. Es wurde gezeigt, dass eine Interferonstimulation humaner Zellen zu einer verstärkten Expression des ND10 Matrixproteins PML und des assoziierten Proteins Sp100 führt, was mit einer Vergrößerung und einer Vermehrung dieser Strukturen einhergeht (Chelbi-Alix et al. 1995, Everett und Chelbi-Alix 2007, Guldner et al. 1992). Diese Beobachtung ist umso interessanter, da mit Hilfe eines Gen-„knock-downs“ mittels retroviral exprimierter siRNA verdeutlicht wurde, dass PML und Daxx einen reprimierenden Effekt auf die Genexpression und somit die Virusreplikation ausüben können (Tang und Maul 2006, Tavalai et al. 2008, Tavalai et al. 2006, Woodhall et al. 2006). Dementsprechend verschlechtert sich die Virusreplikation in Zellen, in denen PML künstlich oder durch Interferonstimulation überexprimiert wird (Ahn und Hayward 2000). Deshalb ist es nicht verwunderlich, dass viele Viren spezielle Proteine besitzen, die mit diesen ND10 interagieren und sie zerstören können, umso eine ideale Replikationsumgebung zu schaffen. So besitzt z.B. das „Kaposi-Sarcoma-assoziierte-Herpesvirus“ (KSHV) das Protein LANA2 um die ND10 Strukturen zu zerstören (Marcos-Villar et al. 2009). Auch das murine  $\gamma$ -Herpesvirus-68 besitzt mit dem ORF75c Tegument Protein die Möglichkeit, die nukleären ND10 Substrukturen zu zerstören, um eine stärkere Replikation durchlaufen zu können (Ling et al. 2008). Ein weiteres sehr bekanntes PML-Interaktionsprotein ist das ICP0 von „Herpes-Simplex-Virus-1“ (HSV-1), das ebenfalls zu einer Zerstörung der PML-bodies führt (Maul et al. 1993). Für die Gruppe der Zytomegalieviren (CMV) wie das humane CMV, das murine CMV und das Ratten-CMV (RCMV) konnte gezeigt werden, dass diese die nukleären ND10 Strukturen mit dem kurz nach der Infektion exprimierten Protein IE1 zerstören können, was mit einer gesteigerten Transkriptionsaktivität einhergeht (Ahn und Hayward 2000, Sandford et al. 2009, Tang und Maul 2003).

Mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen konnte gezeigt werden, dass MCMV/h die ND10 Strukturen mit einer größeren Effizienz zerstört als dies nach einer MCMV/wt Infektion der Fall ist (Abbildung 26). Die konstruierte Revertante RevM112 verhielt sich diesbezüglich wie

MCMV/wt und zerstörte die ND10 Strukturen kaum, wobei M112*mut* einen intermediären Phänotyp zeigte (Abbildung 26). Die Zerstörung wird hierbei aber nicht direkt durch die mutierten Proteine der M112/113 Genregion bewerkstelligt, da eine Transfektion dieser Genregion in humane RPE-1 Zellen keine Zerstörung der ND10 Strukturen verursachte (Abbildung 27). Bei diesen Transfektionen konnte aber deutlich gezeigt werden, dass die Zerstörung der ND10 in humanen Zellen ebenfalls durch das murine IE1 verursacht werden kann (Abbildung 27). Dies steht im Widerspruch zu einer Arbeit von Maul und Kollegen, die keine Zerstörung der ND10 in humanen Zellen durch murines IE1 feststellen konnten (Tang und Maul 2006). Die Zellen wurden hierbei aber infiziert und nicht wie in dieser Arbeit transfiziert. Die unterschiedlichen Ansätze (Infektion vs. Transfektion) könnten möglicherweise die widersprüchlichen Beobachtungen erklären, da sie eine unterschiedlich starke initiale Genexpression nach sich ziehen. Außerdem wäre es auch denkbar, dass diese Diskrepanz durch die Verwendung unterschiedlicher Zellarten zustande kommt.

Warum aber kann nach Infektion humaner Zellen mit MCMV/wt nur eine schwache Zerstörung der ND10 beobachtet werden und nach Infektion mit MCMV/h eine deutlich stärkere Zerstörung? Im Genbereich für IE1 in MCMV/h wurden keine Mutationen gefunden, die einen Einfluss auf die Zerstörung der ND10 haben könnten. Bei der Zerstörung der ND10 durch MCMV/h scheint es sich vielmehr um einen indirekten Effekt zu handeln oder aber um einen alternativen Mechanismus. Dass es zur Zerstörung der ND10 noch andere Mechanismen geben muss, wurde mit einer MCMV-IE1-Deletionsmutante (MCMV/ $\Delta$ IE) gezeigt (Ghazal et al. 2005). Diese Mutante ist zwar immer noch in der Lage ND10 Strukturen zu zerstören, allerdings geschieht dies mit einer deutlichen zeitlichen Retardierung. Erst 24 h nach Infektion muriner Zellen mit MCMV/ $\Delta$ IE ist das Ausmaß der Zerstörung vergleichbar mit MCMV/wt (Ghazal et al. 2005). Zusätzlich konnte durch Proteomanalyse gezeigt werden, dass es einige weitere Proteine gibt, deren jeweilige Funktionen bisher nicht bekannt sind, die aber deutlich mit den ND10 Strukturen assoziiert sind und eventuell an der Dispersion durch einen alternativen Mechanismus beteiligt sein könnten (Salsman et al. 2008). Zwar wurde diese Studie mit HCMV Proteinen durchgeführt, aber es ist zu erwarten, dass unbekannte ND10 assoziierte virale Proteine auch in MCMV zu finden sind und dass diese an einem IE1 unabhängigen Mechanismus der ND10 Dispersion beteiligt sein könnten. Trotzdem erklärt dies ebenfalls nicht, warum nach Infektion humaner Zellen mit MCMV/wt die ND10 Strukturen vermehrt intakt bleiben. Es kann angenommen werden, dass ein alternativer Mechanismus auch in diesem Szenario wirksam sein sollte. Leider gibt es für

diese Beobachtung keine befriedigende Erklärung und deshalb sind weitere Untersuchungen notwendig, um diese Diskrepanz zu erklären. Da sich die Replikationszentren in der Peripherie der ND10 ausbilden und dies mit größerer Effizienz in MCMV/h und M112*mut* erfolgt, ist es durchaus vorstellbar, dass diese Ausbildung einen bisher unbekanntem Einfluss auf die ND10 Strukturen haben kann. Somit müsste dann postuliert werden, dass ein solcher unbekannter Einfluss auf die ND10 nach Infektion humaner Zellen mit MCMV/wt fehlt, da hierbei nur kleine Replikationszentren gebildet werden und beobachtet wurde, dass die ND10 weitestgehend intakt bleiben (Abbildung 26). Die nicht zerstörten ND10 lagern sich in der Peripherie der kleinen, rundlichen Replikationskompartimente an (Abbildung 29) und können so, in Analogie zu HCMV, eine effektive Transkription und damit auch eine effektive Replikation negativ beeinflussen (Ahn und Hayward 2000).

Eine Zerstörung der ND10 Strukturen ist allerdings nicht ausreichend, um eine Replikation von MCMV/wt in nicht-permissiven humanen RPE-1 Zellen zu unterstützen. Dies wurde durch unabhängige experimentelle Ansätze gezeigt. Zum einen wurden Immunfluoreszenzen zur Analyse der ND10 Strukturen nach Infektion humaner Zellen mit MCMV/hIE1 durchgeführt; einer Virusmutante, die das HCMV IE1 Protein unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven Promoters exprimiert (Jurak und Brune 2006). Dieses Virus ist nicht in der Lage, erfolgreich in humanen RPE-1 oder MRC-5 Zellen zu replizieren und Virusnachkommen zu bilden (Jurak und Brune 2006), obwohl es mit einem prozentualen Anteil von circa 60 % die ND10 Strukturen genauso effizient zerstört wie MCMV/h (Abbildung 28). Auch ein siRNA vermittelter „knock-down“ von PML half MCMV/wt nicht, in den infizierten humanen Zellen eine permissive Infektion zu etablieren, verschaffte aber der Mutante M112*mut* einen deutlichen Replikationsvorteil (Abbildung 30). Die Tatsache, dass die Virusmutante MCMV/hIE1 nicht in den humanen Zellen wächst, steht erneut im Widerspruch zur bereits zitierten Arbeit von Maul und Kollegen (Tang und Maul 2006). In dieser Arbeit wird beschrieben, dass MCMV/hIE1 in humanen Fibroblasten in der Lage ist, zu replizieren und einen geringen Virustiter zu bilden. Sie zogen daraus den Schluss, dass die Expression von HCMV IE1 dabei helfen kann, dass MCMV die Speziesbarriere überwindet (Tang und Maul 2006). Zur Bestimmung der Virusmenge, die nach Infektion der humanen Zellen gebildet wurde, verwendeten die Autoren eine spezielle Zelllinie, die bei der Titration 60-fach sensitiver ist als normale NIH-3T3 Zellen. Diese sensitive Zelllinie erlaubte den Autoren auch die Detektion von sehr geringen Virusmengen im Zellkulturüberstand nach Infektion humaner Zellen. Allerdings birgt die Verwendung dieser sensitiven Zelllinie aber auch die Gefahr, dass nur schwer zwischen wirklicher Virusneuproduktion und restlicher

Virusmenge nach der Infektion unterschieden werden kann, insbesondere wenn der Virustiter minimal ist. Deswegen wäre es interessant zu erfahren, ob die Aussage, dass HCMV IE1 dabei behilflich ist die Speziesbarriere zu überwinden, auch noch zutrifft, wenn man diese Titration auf normalen NIH-3T3 Zellen wiederholen würde.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch deutlich, dass die alleinige Zerstörung der ND10 Strukturen nicht ausreichend ist, um nicht-permissive Zellen in permissive zu überführen. Erst mit dem Auftreten weiterer Mutationen, die per se eine Replikation erlauben, so wie dies bei MCMV/h bzw. M112*mut* der Fall ist, ist ein Vorteil bei der Replikation in den artfremden humanen Zellen durch die Zerstörung der ND10 gegeben (Abbildung 30).

Das konstitutiv in ND10 Strukturen lokalisierte Daxx Protein übt, genauso wie PML, einen negativen Effekt auf die Virusreplikation aus (Tavalai et al. 2008, Woodhall et al. 2006). Um diesen reprimierenden Effekt zu umgehen, besitzt HCMV das virale Protein pp71 (UL82), welches sich im Tegument befindet (Nowak et al. 1984) und bei Infektion sofort in die Wirtszelle geschleust wird. Das Genprodukt pp71 gelangt in den Nukleus und interagiert mit dem Daxx Protein in den ND10 Strukturen, welches daraufhin degradiert wird (Hwang und Kalejta 2007). Durch diesen Abbau wird die Daxx-vermittelte Genrepression in der frühen Infektionsphase aufgehoben und eine effiziente Transkription ist somit gewährleistet (Cantrell und Bresnahan 2006, Ishov et al. 2002, Saffert und Kalejta 2006). Bisher ist kein homologes Protein in MCMV bekannt, welches die Aufgabe von pp71 aus HCMV übernimmt. Tatsächlich kommt es nach Infektion muriner Zellen mit MCMV auch zu keiner Daxx-Degradation wie bei HCMV (Tang und Maul 2003). Trotzdem muss die reprimierende Wirkung von Daxx über einen bisher unbekanntem Mechanismus kompensiert werden. Hierbei wird spekuliert, dass das MCMV IE1 Protein diese Aufgabe übernimmt (Maul und Negorev 2008). Dass das murine Daxx in Analogie zum humanen Daxx ebenfalls einen repressiven Charakter hat, konnte durch Infektion muriner Daxx-„knock-out“-Zellen gezeigt werden (Tang und Maul 2006).

Ein siRNA-vermittelter „knock-down“ von Daxx in humanen Zellen erlaubt aber ebenfalls keine Replikation von MCMV/wt, so wie es schon bei PML der Fall war. Stattdessen führt ein „knock-down“ von Daxx zu einer schlechteren Replikation von M112*mut* in humanen Zellen, ganz im Gegensatz zum PML „knock-down“ (Abbildung 30). Allerdings ist schon beschrieben worden, dass Daxx-„knock-out“-Zellen sensitiver gegenüber apoptotischen Signalen werden, da Daxx u.a. an der Repression proapoptotischer Gene beteiligt ist (Chen

und Chen 2003, Croxton et al. 2006, Michaelson und Leder 2003). Da durch die Infektion humaner Zellen mit MCMV eine Induktion der Apoptose erfolgt (Jurak und Brune 2006), wäre es vorstellbar, dass sich die Effekte addieren und es somit zu einem verstärkten Zelltod infizierter Zellen kommt. Dies würde bedeuten, dass die initiale Menge an infizierten Zellen geringer ist und dementsprechend dauert es auch länger bis Virus im Überstand detektierbar wird.

#### **4.5 Spezies-Spezifität von MCMV/h *in vivo***

Die hier präsentierten Ergebnisse stammen alle aus *in vitro* Experimenten. In murinen Zellen ließ sich, im Gegensatz zu den humanen Zellen, kein Unterschied im Replikationsverhalten zwischen MCMV/h und MCMV/wt feststellen. Es stellt sich somit jedoch die Frage, ob dies auch *in vivo* der Fall ist oder ob MCMV/h eventuell pathogener ist als das parentale MCMV/wt. Es wäre also zu überlegen, ob es sinnvoll ist einen tierexperimentellen Ansatz zu verfolgen, umso neue Erkenntnisse über eventuelle Pathogenitätsmechanismen zu gewinnen.

Eine weitere wichtige Frage, die sich durch die erzielten Ergebnisse ergibt ist, ob MCMV/h ebenfalls in der Lage ist, *in vivo* im Menschen eine Infektion zu etablieren. Diese Frage kann natürlich nicht mit absoluter Sicherheit beantwortet werden, aber es gibt einige Fakten, die gegen ein solches Szenario sprechen. Wie bereits erwähnt, setzte die Zytomegalievirus-Artbildung in etwa zeitgleich mit der Wirts-Artbildung ein (McGeoch et al. 1995). Hierbei kam es zu einer sehr starken und speziellen Anpassung des Virus an den jeweiligen Wirt. Dies betrifft sämtliche Teilaspekte des viralen Replikationszyklus, aber auch Aspekte wie Zelltropismus, Apoptoseinhibition, Dissemination und Immunevasion im Wirtsorganismus. Genomuntersuchungen an HCMV zeigten, dass ungefähr  $\frac{1}{4}$  aller Gene essentiell für eine Replikation *in vitro* sind; viele weitere Gene kodieren Faktoren für eine verbesserte Replikation, Virulenz, Pathogenese oder Zelltropismus (Dunn et al. 2003, Yu et al. 2003). Ob all diese Faktoren auch bei einer Infektion im artfremden Organismus ihre jeweilige Funktion in vollem Umfang wahrnehmen können, muss stark bezweifelt werden und wurde für einzelne Gene, zumindest in Zellkultur, auch schon gezeigt (vgl. Abschnitt 4.2). Zwischen den verschiedenen Spezies gibt es z.B. Unterschiede in der Signalübertragung oder der Immunabwehr und folglich können die speziesspezifisch adaptierten Proteine nicht funktionell sein. Man kann daher mit hoher Wahrscheinlichkeit annehmen, dass insbesondere von dem hier charakterisierten MCMV/h, aber auch von anderen Zytomegaliestämmen, keine direkte Gefährdung für den Experimentator und andere Menschen ausgeht.

#### 4.6 Schlussfolgerung

Zytomegalieviren werden als strikt speziesspezifisch eingestuft. Eine permissive Infektion ist nur in Zellen der eigenen Art oder in Zellen nah verwandter Arten möglich. Grundlage dieser Arbeit war die Beobachtung, dass es bei MCMV spontan zu Adaptationen an humane Zellen kommen kann. Punktmutationen können hierbei schon ausreichend sein, um eine permissive Infektion in humanen Zellen zu etablieren. MCMV/h entstand durch eine solche spontane Adaptation und erlangte hierdurch die Eigenschaft, hohe Virustiter in relativ kurzer Zeit in humanen RPE-1 Zellen zu produzieren. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Mutationen in der Genregion M112/113 ausreichend sind, um den Phänotypem von MCMV/h zumindest teilweise zu rekonstituieren. Hierbei scheinen insbesondere die Mutationen in der 87 kDa Isoform der E1 Proteine von Bedeutung zu sein. Allerdings zeigte die konstruierte Mutante M112*mut*, die die gefundenen Mutationen in M112/113 beinhaltet, ein schwächeres und zeitlich retardiertes Replikationsverhalten im Vergleich zu MCMV/h. Es ist deshalb sehr wahrscheinlich, dass es zusätzliche Mutationen gibt, die den Phänotyp von MCMV/h mit verursachen. Weitere Sequenzierungen förderten eine zusätzliche Mutation im Gen m119.1 in MCMV/h zutage, die mit einem Aminosäureaustausch einhergeht und nicht in MCMV/wt zu finden ist. Über die Funktion des Gens m119.1 ist bisher nichts bekannt. Dennoch sollte der Einfluss bei einer Infektion humaner Zellen untersucht werden. Auch das Genomende ab m149 sollte weiter sequenziert werden, um so keinen Bereich möglicher Mutationen auszulassen. Die Identifikation zusätzlicher relevanter Mutationen trägt zum einen dazu bei, die Funktion weiterer Gene zu bestimmen und zu analysieren und zum anderen natürlich zum allgemeinen Verständnis der Spezies-Spezifität der Zytomegalieviren. Die molekularen Grundlagen speziesspezifischer Infektionen zu verstehen ist wichtig, da es in jüngster Vergangenheit immer wieder zu neuartigen Zoonosen, teilweise mit gravierenden Folgen, kam. Die Grundlagen der Spezies-Spezifität der Zytomegalieviren zu verstehen ist umso wichtiger, da es kein geeignetes Tiermodell gibt, um eine HCMV Infektion *in vivo* zu simulieren. Kennt man die molekularen Grundlagen, die eine Replikation von MCMV in humanen Zellen erlauben, lassen sich hierdurch eventuell Rückschlüsse auf die Ursachen der Spezies-Spezifität von HCMV ziehen, wobei diese aber auch ganz anderer Natur sein können und möglicherweise auf anderen Mechanismen beruhen. Versteht man aber deren molekularen Grundlagen kann HCMV eventuell genetisch so manipuliert werden, dass eine Replikation in Mauszellen und letztlich auch in Mäusen möglich ist. Mit einem solchen *in vivo* „HCMV-Mausmodell“ ließen sich einfach, effektiv und relativ kostengünstig aktuelle Fragen der HCMV Biologie in Bezug auf Latenz und lytische Infektionen beantworten.

---

Desweiteren wäre dies auch ein interessanter *in vivo* Ansatz, um neue Medikamente zu testen und neue Therapiemöglichkeiten zu etablieren.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Ahasan MM, Sweet C. 2007. Murine cytomegalovirus open reading frame m29.1 augments virus replication both in vitro and in vivo. *J Gen Virol* 88: 2941-2951.
2. Ahn JH, Hayward GS. 1997. The major immediate-early proteins IE1 and IE2 of human cytomegalovirus colocalize with and disrupt PML-associated nuclear bodies at very early times in infected permissive cells. *J Virol* 71: 4599-4613.
3. —. 2000. Disruption of PML-associated nuclear bodies by IE1 correlates with efficient early stages of viral gene expression and DNA replication in human cytomegalovirus infection. *Virology* 274: 39-55.
4. Ahn JH, Jang WJ, Hayward GS. 1999. The human cytomegalovirus IE2 and UL112-113 proteins accumulate in viral DNA replication compartments that initiate from the periphery of promyelocytic leukemia protein-associated nuclear bodies (PODs or ND10). *J Virol* 73: 10458-10471.
5. Anders DG, Kacica MA, Pari G, Punturieri SM. 1992. Boundaries and structure of human cytomegalovirus oriLyt, a complex origin for lytic-phase DNA replication. *J Virol* 66: 3373-3384.
6. Angulo A, Ghazal P, Messerle M. 2000. The major immediate-early gene ie3 of mouse cytomegalovirus is essential for viral growth. *J Virol* 74: 11129-11136.
7. Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH. 1990. Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am J Pathol* 136: 593-608.
8. Arnoult D, Bartle LM, Skaletskaya A, Poncet D, Zamzami N, Park PU, Sharpe J, Youle RJ, Goldmacher VS. 2004. Cytomegalovirus cell death suppressor vMIA blocks Bax- but not Bak-mediated apoptosis by binding and sequestering Bax at mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 7988-7993.
9. Arthurs SK, Eid AJ, Pedersen RA, Dierkhising RA, Kremers WK, Patel R, Razonable RR. 2007. Delayed-onset primary cytomegalovirus disease after liver transplantation. *Liver Transpl* 13: 1703-1709.
10. Atalay R, Zimmermann A, Wagner M, Borst E, Benz C, Messerle M, Hengel H. 2002. Identification and expression of human cytomegalovirus transcription units coding for two distinct Fcγ receptor homologs. *J Virol* 76: 8596-8608.
11. Bacchetti S, Graham FL. 1977. Transfer of the gene for thymidine kinase to thymidine kinase-deficient human cells by purified herpes simplex viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 1590-1594.
12. Bernardi R, Pandolfi PP. 2003. Role of PML and the PML-nuclear body in the control of programmed cell death. *Oncogene* 22: 9048-9057.
13. —. 2007. Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 1006-1016.
14. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE. 1998. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279: 349-352.

15. Boldogh I, AbuBakar S, Fons MP, Deng CZ, Albrecht T. 1991. Activation of cellular oncogenes by clinical isolates and laboratory strains of human cytomegalovirus. *J Med Virol* 34: 241-247.
16. Borst EM, Hahn G, Koszinowski UH, Messerle M. 1999. Cloning of the human cytomegalovirus (HCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*: a new approach for construction of HCMV mutants. *J Virol* 73: 8320-8329.
17. Bossy-Wetzel E, Green DR. 1999. Apoptosis: checkpoint at the mitochondrial frontier. *Mutat Res* 434: 243-251.
18. Britt W. 2008. Manifestations of human cytomegalovirus infection: proposed mechanisms of acute and chronic disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 325: 417-470.
19. Brocchieri L, Kledal TN, Karlin S, Mocarski ES. 2005. Predicting coding potential from genome sequence: application to betaherpesviruses infecting rats and mice. *J Virol* 79: 7570-7596.
20. Bruggeman CA, Meijer H, Dormans PH, Debie WM, Grauls GE, van Boven CP. 1982. Isolation of a cytomegalovirus-like agent from wild rats. *Arch Virol* 73: 231-241.
21. Brune W, Menard C, Heesemann J, Koszinowski UH. 2001. A ribonucleotide reductase homolog of cytomegalovirus and endothelial cell tropism. *Science* 291: 303-305.
22. Buck AH, Santoyo-Lopez J, Robertson KA, Kumar DS, Reczko M, Ghazal P. 2007. Discrete clusters of virus-encoded micRNAs are associated with complementary strands of the genome and the 7.2-kilobase stable intron in murine cytomegalovirus. *J Virol* 81: 13761-13770.
23. Bühler B, Keil GM, Weiland F, Koszinowski UH. 1990. Characterization of the murine cytomegalovirus early transcription unit e1 that is induced by immediate-early proteins. *J Virol* 64: 1907-1919.
24. Çam M, Handke W, Picard-Maureau M, Brune W. 2009. Cytomegaloviruses inhibit Bak- and Bax-mediated apoptosis with two separate viral proteins. *Cell Death Differ*.
25. Camozzi D, Pignatelli S, Valvo C, Lattanzi G, Capanni C, Dal Monte P, Landini MP. 2008. Remodelling of the nuclear lamina during human cytomegalovirus infection: role of the viral proteins pUL50 and pUL53. *J Gen Virol* 89: 731-740.
26. Cantrell SR, Bresnahan WA. 2006. Human cytomegalovirus (HCMV) UL82 gene product (pp71) relieves hDaxx-mediated repression of HCMV replication. *J Virol* 80: 6188-6191.
27. Cheeran MC, Lokensgard JR, Schleiss MR. 2009. Neuropathogenesis of congenital cytomegalovirus infection: disease mechanisms and prospects for intervention. *Clin Microbiol Rev* 22: 99-126, Table of Contents.
28. Chelbi-Alix MK, Pelicano L, Quignon F, Koken MH, Venturini L, Stadler M, Pavlovic J, Degos L, de Thé H. 1995. Induction of the PML protein by interferons in normal and APL cells. *Leukemia* 9: 2027-2033.
29. Chen LY, Chen JD. 2003. Daxx silencing sensitizes cells to multiple apoptotic pathways. *Mol Cell Biol* 23: 7108-7121.
30. Cheng J, Ke Q, Jin Z, Wang H, Kocher O, Morgan JP, Zhang J, Crumpacker CS. 2009. Cytomegalovirus infection causes an increase of arterial blood pressure. *PLoS Pathog* 5: e1000427.

31. Cheung TW, Teich SA. 1999. Cytomegalovirus infection in patients with HIV infection. *Mt Sinai J Med* 66: 113-124.
32. Child SJ, Hanson LK, Brown CE, Janzen DM, Geballe AP. 2006. Double-stranded RNA binding by a heterodimeric complex of murine cytomegalovirus m142 and m143 proteins. *J Virol* 80: 10173-10180.
33. Ciocco-Schmitt GM, Karabekian Z, Godfrey EW, Stenberg RM, Campbell AE, Kerry JA. 2002. Identification and characterization of novel murine cytomegalovirus M112-113 (e1) gene products. *Virology* 294: 199-208.
34. Compton MM. 1992. A biochemical hallmark of apoptosis: internucleosomal degradation of the genome. *Cancer Metastasis Rev* 11: 105-119.
35. Compton T, Kurt-Jones EA, Boehme KW, Belko J, Latz E, Golenbock DT, Finberg RW. 2003. Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J Virol* 77: 4588-4596.
36. Condit RC. 2001. Principles of Virology. In Knipe DM, Howley PM (eds.). *Fields Virology*. 4th edn. Lippincott-Williams & Wilkins. Philadelphia.
37. Croxton R, Puto LA, de Belle I, Thomas M, Torii S, Hanaii F, Cuddy M, Reed JC. 2006. Daxx represses expression of a subset of antiapoptotic genes regulated by nuclear factor-kappaB. *Cancer Res* 66: 9026-9035.
38. Dallas PB, Lyons PA, Hudson JB, Scalzo AA, Shellam GR. 1994. Identification and characterization of a murine cytomegalovirus gene with homology to the UL25 open reading frame of human cytomegalovirus. *Virology* 200: 643-650.
39. Danner SA. 1995. Management of cytomegalovirus disease. *AIDS* 9 Suppl 2: S3-S8.
40. Datsenko KA, Wanner BL. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 6640-6645.
41. Davison AJ, Trus BL, Cheng N, Steven AC, Watson MS, Cunningham C, Le Deuff RM, Renault T. 2005. A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *J Gen Virol* 86: 41-53.
42. Dolan A, et al. 2004. Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *J Gen Virol* 85: 1301-1312.
43. Dölken L, Perot J, Cognat V, Alioua A, John M, Soutschek J, Ruzsics Z, Koszinowski U, Voinnet O, Pfeffer S. 2007. Mouse cytomegalovirus microRNAs dominate the cellular small RNA profile during lytic infection and show features of posttranscriptional regulation. *J Virol* 81: 13771-13782.
44. Dunn W, Chou C, Li H, Hai R, Patterson D, Stolc V, Zhu H, Liu F. 2003. Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 14223-14228.
45. Ellsmore V, Reid GG, Stow ND. 2003. Detection of human cytomegalovirus DNA replication in non-permissive Vero and 293 cells. *J Gen Virol* 84: 639-645.
46. Elmore S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35: 495-516.
47. Everett RD, Chelbi-Alix MK. 2007. PML and PML nuclear bodies: implications in antiviral defence. *Biochimie* 89: 819-830.

48. Evers DL, Wang X, Huang ES. 2004. Cellular stress and signal transduction responses to human cytomegalovirus infection. *Microbes Infect* 6: 1084-1093.
49. Feire AL, Koss H, Compton T. 2004. Cellular integrins function as entry receptors for human cytomegalovirus via a highly conserved disintegrin-like domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 15470-15475.
50. Fioretti A, Furukawa T, Santoli D, Plotkin SA. 1973. Nonproductive infection of guinea pig cells with human cytomegalovirus. *J Virol* 11: 998-1003.
51. Fortunato EA, McElroy AK, Sanchez I, Spector DH. 2000. Exploitation of cellular signaling and regulatory pathways by human cytomegalovirus. *Trends Microbiol* 8: 111-119.
52. Gandhi MK, Khanna R. 2004. Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *Lancet Infect Dis* 4: 725-738.
53. Ghazal P, Visser AE, Gustems M, Garcia R, Borst EM, Sullivan K, Messerle M, Angulo A. 2005. Elimination of *ie1* significantly attenuates murine cytomegalovirus virulence but does not alter replicative capacity in cell culture. *J Virol* 79: 7182-7194.
54. Goldmacher VS. 2005. Cell death suppression by cytomegaloviruses. *Apoptosis* 10: 251-265.
55. Goldmacher VS, et al. 1999. A cytomegalovirus-encoded mitochondria-localized inhibitor of apoptosis structurally unrelated to Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 12536-12541.
56. Grant SG, Jessee J, Bloom FR, Hanahan D. 1990. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 4645-4649.
57. Guldner HH, Szosteki C, Grotzinger T, Will H. 1992. IFN enhance expression of Sp100, an autoantigen in primary biliary cirrhosis. *J Immunol* 149: 4067-4073.
58. Hahn BH, Shaw GM, De Cock KM, Sharp PM. 2000. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* 287: 607-614.
59. Harvey DM, Levine AJ. 1991. p53 alteration is a common event in the spontaneous immortalization of primary BALB/c murine embryo fibroblasts. *Genes Dev* 5: 2375-2385.
60. Hedrick RP, Gilad O, Yun S, Spangenberg JV, Marty GD, Nordhausen RW, Kebus MJ, Bercovier H, Eldar A. 2000. A Herpesvirus Associated with Mass Mortality of Juvenile and Adult Koi, a Strain of Common Carp. *Journal of Aquatic Animal Health* 12: 44-57.
61. Heeney JL, Dalgleish AG, Weiss RA. 2006. Origins of HIV and the evolution of resistance to AIDS. *Science* 313: 462-466.
62. Hofmann TG, Will H. 2003. Body language: the function of PML nuclear bodies in apoptosis regulation. *Cell Death Differ* 10: 1290-1299.
63. Homman-Loudiyi M, Hultenby K, Britt W, Soderberg-Naucler C. 2003. Envelopment of human cytomegalovirus occurs by budding into Golgi-derived vacuole compartments positive for gB, Rab 3, trans-golgi network 46, and mannosidase II. *J Virol* 77: 3191-3203.
64. Hwang J, Kalejta RF. 2007. Proteasome-dependent, ubiquitin-independent degradation of Daxx by the viral pp71 protein in human cytomegalovirus-infected cells. *Virology* 367: 334-338.

- 
65. Ishov AM, Maul GG. 1996. The periphery of nuclear domain 10 (ND10) as site of DNA virus deposition. *J Cell Biol* 134: 815-826.
  66. Ishov AM, Stenberg RM, Maul GG. 1997. Human cytomegalovirus immediate early interaction with host nuclear structures: definition of an immediate transcript environment. *J Cell Biol* 138: 5-16.
  67. Ishov AM, Vladimirova OV, Maul GG. 2002. Daxx-mediated accumulation of human cytomegalovirus tegument protein pp71 at ND10 facilitates initiation of viral infection at these nuclear domains. *J Virol* 76: 7705-7712.
  68. Iskenderian AC, Huang L, Reilly A, Stenberg RM, Anders DG. 1996. Four of eleven loci required for transient complementation of human cytomegalovirus DNA replication cooperate to activate expression of replication genes. *J Virol* 70: 383-392.
  69. Iwayama S, Yamamoto T, Furuya T, Kobayashi R, Ikuta K, Hirai K. 1994. Intracellular localization and DNA-binding activity of a class of viral early phosphoproteins in human fibroblasts infected with human cytomegalovirus (Towne strain). *J Gen Virol* 75 ( Pt 12): 3309-3318.
  70. Jacobs JP, Jones CM, Baille JP. 1970. Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature* 227: 168-170.
  71. Jarvis MA, Nelson JA. 2002. Human cytomegalovirus persistence and latency in endothelial cells and macrophages. *Curr Opin Microbiol* 5: 403-407.
  72. Jin Z, El-Deiry WS. 2005. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther* 4: 139-163.
  73. Johnson NP, Mueller J. 2002. Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 "Spanish" influenza pandemic. *Bull Hist Med* 76: 105-115.
  74. Jurak I, Brune W. 2006. Induction of apoptosis limits cytomegalovirus cross-species infection. *EMBO J* 25: 2634-2642.
  75. Jurak I, Schumacher U, Simic H, Voigt S, Brune W. 2008. Murine cytomegalovirus m38.5 protein inhibits Bax-mediated cell death. *J Virol* 82: 4812-4822.
  76. Kaerber G. 1931. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie*. 162. 480.
  77. Kalejta RF. 2008. Functions of human cytomegalovirus tegument proteins prior to immediate early gene expression. *Curr Top Microbiol Immunol* 325: 101-115.
  78. Kalejta RF, Shenk T. 2002. Manipulation of the cell cycle by human cytomegalovirus. *Front Biosci* 7: d295-306.
  79. —. 2003. The human cytomegalovirus UL82 gene product (pp71) accelerates progression through the G1 phase of the cell cycle. *J Virol* 77: 3451-3459.
  80. Kalejta RF, Bechtel JT, Shenk T. 2003. Human cytomegalovirus pp71 stimulates cell cycle progression by inducing the proteasome-dependent degradation of the retinoblastoma family of tumor suppressors. *Mol Cell Biol* 23: 1885-1895.

81. Kattenhorn LM, Mills R, Wagner M, Lomsadze A, Makeev V, Borodovsky M, Ploegh HL, Kessler BM. 2004. Identification of proteins associated with murine cytomegalovirus virions. *J Virol* 78: 11187-11197.
82. Kaufmann SH, Mesner PW, Jr., Samejima K, Tone S, Earnshaw WC. 2000. Detection of DNA cleavage in apoptotic cells. *Methods Enzymol* 322: 3-15.
83. Kavanagh DG, Koszinowski UH, Hill AB. 2001. The murine cytomegalovirus immune evasion protein m4/gp34 forms biochemically distinct complexes with class I MHC at the cell surface and in a pre-Golgi compartment. *J Immunol* 167: 3894-3902.
84. Kawaoka Y, Krauss S, Webster RG. 1989. Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *J Virol* 63: 4603-4608.
85. Kedhar SR, Jabs DA. 2007. Cytomegalovirus retinitis in the era of highly active antiretroviral therapy. *Herpes* 14: 66-71.
86. Keele BF, et al. 2006. Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science* 313: 523-526.
87. Kerry JA, Priddy MA, Jervy TY, Kohler CP, Staley TL, Vanson CD, Jones TR, Iskenderian AC, Anders DG, Stenberg RM. 1996. Multiple regulatory events influence human cytomegalovirus DNA polymerase (UL54) expression during viral infection. *J Virol* 70: 373-382.
88. Kim KS, Carp RI. 1971. Growth of murine cytomegalovirus in various cell lines. *J Virol* 7: 720-725.
89. —. 1972. Abortive infection of human diploid cells by murine cytomegalovirus. *Infect Immun* 6: 793-797.
90. Kim KS, Sapienza V, Carp RI. 1974. Comparative studies of the Smith and Raynaud strains of murine cytomegalovirus. *Infect Immun* 10: 672-674.
91. Kinsella TM, Nolan GP. 1996. Episomal vectors rapidly and stably produce high-titer recombinant retrovirus. *Hum Gene Ther* 7: 1405-1413.
92. Kriehoff-Henning E, Hofmann TG. 2008. Role of nuclear bodies in apoptosis signalling. *Biochim Biophys Acta* 1783: 2185-2194.
93. Kuiken T, Holmes EC, McCauley J, Rimmelzwaan GF, Williams CS, Grenfell BT. 2006. Host species barriers to influenza virus infections. *Science* 312: 394-397.
94. Lafemina RL, Hayward GS. 1988. Differences in cell-type-specific blocks to immediate early gene expression and DNA replication of human, simian and murine cytomegalovirus. *J Gen Virol* 69 ( Pt 2): 355-374.
95. Landolfo S, Gariglio M, Gribaudo G, Lembo D. 2003. The human cytomegalovirus. *Pharmacol Ther* 98: 269-297.
96. Landolt GA, Olsen CW. 2007. Up to new tricks - a review of cross-species transmission of influenza A viruses. *Anim Health Res Rev* 8: 1-21.

- 
97. Lee EC, Yu D, Martinez de Velasco J, Tessarollo L, Swing DA, Court DL, Jenkins NA, Copeland NG. 2001. A highly efficient *Escherichia coli*-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomics* 73: 56-65.
  98. Lemmermann NA, Gergely K, Bohm V, Deegen P, Daubner T, Reddehase MJ. 2009. Immune Evasion Proteins of Murine Cytomegalovirus Preferentially Affect Cell Surface Display of Recently-Generated Peptide Presentation Complexes. *J Virol*.
  99. Li J, Yamamoto T, Ohtsubo K, Shirakata M, Hirai K. 1999. Major product pp43 of human cytomegalovirus U(L)112-113 gene is a transcriptional coactivator with two functionally distinct domains. *Virology* 260: 89-97.
  100. Ling PD, Tan J, Sewatanon J, Peng R. 2008. Murine gammaherpesvirus 68 open reading frame 75c tegument protein induces the degradation of PML and is essential for production of infectious virus. *J Virol* 82: 8000-8012.
  101. Ludwig A, Hengel H. 2009. Epidemiological impact and disease burden of congenital cytomegalovirus infection in Europe. *Euro Surveill* 14: 26-32.
  102. Mack C, Sickmann A, Lembo D, Brune W. 2008. Inhibition of proinflammatory and innate immune signaling pathways by a cytomegalovirus RIP1-interacting protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 3094-3099.
  103. Mahy BW, Brown CC. 2000. Emerging zoonoses: crossing the species barrier. *Rev Sci Tech* 19: 33-40.
  104. Mahy BW, Kangro HO. 1996. *Virology methods manual*. Academic Press. San Diego. CA.
  105. Maidji E, Genbacev O, Chang HT, Pereira L. 2007. Developmental regulation of human cytomegalovirus receptors in cytotrophoblasts correlates with distinct replication sites in the placenta. *J Virol* 81: 4701-4712.
  106. Malim MH, Emerman M. 2008. HIV-1 accessory proteins--ensuring viral survival in a hostile environment. *Cell Host Microbe* 3: 388-398.
  107. Malm G, Engman ML. 2007. Congenital cytomegalovirus infections. *Semin Fetal Neonatal Med* 12: 154-159.
  108. Marchini A, Liu H, Zhu H. 2001. Human cytomegalovirus with IE-2 (UL122) deleted fails to express early lytic genes. *J Virol* 75: 1870-1878.
  109. Marcos-Villar L, Lopitz-Otsoa F, Gallego P, Munoz-Fontela C, Gonzalez-Santamaria J, Campagna M, Shou-Jiang G, Rodriguez MS, Rivas C. 2009. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus protein LANA2 disrupts PML oncogenic domains and inhibits PML-mediated transcriptional repression of the survivin gene. *J Virol* 83: 8849-8858.
  110. Maul GG. 1998. Nuclear domain 10, the site of DNA virus transcription and replication. *Bioessays* 20: 660-667.
  111. Maul GG, Negorev D. 2008. Differences between mouse and human cytomegalovirus interactions with their respective hosts at immediate early times of the replication cycle. *Med Microbiol Immunol* 197: 241-249.

112. Maul GG, Guldner HH, Spivack JG. 1993. Modification of discrete nuclear domains induced by herpes simplex virus type 1 immediate early gene 1 product (ICP0). *J Gen Virol* 74 ( Pt 12): 2679-2690.
113. McCormick AL, Meiering CD, Smith GB, Mocarski ES. 2005. Mitochondrial cell death suppressors carried by human and murine cytomegalovirus confer resistance to proteasome inhibitor-induced apoptosis. *J Virol* 79: 12205-12217.
114. McCormick AL, Skaletskaya A, Barry PA, Mocarski ES, Goldmacher VS. 2003. Differential function and expression of the viral inhibitor of caspase 8-induced apoptosis (vICA) and the viral mitochondria-localized inhibitor of apoptosis (vMIA) cell death suppressors conserved in primate and rodent cytomegaloviruses. *Virology* 316: 221-233.
115. McFadden G. 2005. Poxvirus tropism. *Nat Rev Microbiol* 3: 201-213.
116. McGeoch DJ, Rixon FJ, Davison AJ. 2006. Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Res* 117: 90-104.
117. McGeoch DJ, Cook S, Dolan A, Jamieson FE, Telford EA. 1995. Molecular phylogeny and evolutionary timescale for the family of mammalian herpesviruses. *J Mol Biol* 247: 443-458.
118. Ménard C, Wagner M, Ruzsics Z, Holak K, Brune W, Campbell AE, Koszinowski UH. 2003. Role of murine cytomegalovirus US22 gene family members in replication in macrophages. *J Virol* 77: 5557-5570.
119. Messerle M, Crnkovic I, Hammerschmidt W, Ziegler H, Koszinowski UH. 1997. Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 14759-14763.
120. Mettenleiter TC, Klupp BG, Granzow H. 2006. Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. *Curr Opin Microbiol* 9: 423-429.
121. Michaelson JS, Leder P. 2003. RNAi reveals anti-apoptotic and transcriptionally repressive activities of DAXX. *J Cell Sci* 116: 345-352.
122. Milbradt J, Auerochs S, Sticht H, Marschall M. 2009. Cytomegaloviral proteins that associate with the nuclear lamina: components of a postulated nuclear egress complex. *J Gen Virol* 90: 579-590.
123. Mocarski ESJ, Shenk T, Pass RF. 2007. Cytomegaloviruses. In Fields B, Knipe DM, Howley PM (eds.), *Fields Virology*. 5th edn. Lippincott-Williams & Wilkins. Philadelphia.
124. Modrow S, Falke D, Truyen U. 2003. *Molekulare Virologie*. 2. Auflage. Spektrum. Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin
125. Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63.
126. Murphy E, Rigoutsos I, Shibuya T, Shenk TE. 2003. Reevaluation of human cytomegalovirus coding potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 13585-13590.
127. Negorev D, Maul GG. 2001. Cellular proteins localized at and interacting within ND10/PML nuclear bodies/PODs suggest functions of a nuclear depot. *Oncogene* 20: 7234-7242.

128. Nerheim PL, Meier JL, Vasef MA, Li WG, Hu L, Rice JB, Gavrilu D, Richenbacher WE, Weintraub NL. 2004. Enhanced cytomegalovirus infection in atherosclerotic human blood vessels. *Am J Pathol* 164: 589-600.
129. Nowak B, Gmeiner A, Sarnow P, Levine AJ, Fleckenstein B. 1984. Physical mapping of human cytomegalovirus genes: identification of DNA sequences coding for a virion phosphoprotein of 71 kDa and a viral 65-kDa polypeptide. *Virology* 134: 91-102.
130. Nunez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N. 1998. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* 17: 3237-3245.
131. Ogawa-Goto K, Tanaka K, Gibson W, Moriishi E, Miura Y, Kurata T, Irie S, Sata T. 2003. Microtubule network facilitates nuclear targeting of human cytomegalovirus capsid. *J Virol* 77: 8541-8547.
132. Oliveira SA, Park SH, Lee P, Bendelac A, Shenk TE. 2002. Murine cytomegalovirus m02 gene family protects against natural killer cell-mediated immune surveillance. *J Virol* 76: 885-894.
133. Osborn JE, Walker DL. 1968. Enhancement of infectivity of murine cytomegalovirus in vitro by centrifugal inoculation. *J Virol* 2: 853-858.
134. Pari GS, Anders DG. 1993. Eleven loci encoding trans-acting factors are required for transient complementation of human cytomegalovirus oriLyt-dependent DNA replication. *J Virol* 67: 6979-6988.
135. Park MY, Kim YE, Seo MR, Lee JR, Lee CH, Ahn JH. 2006. Interactions among four proteins encoded by the human cytomegalovirus UL112-113 region regulate their intranuclear targeting and the recruitment of UL44 to prereplication foci. *J Virol* 80: 2718-2727.
136. Parrish CR, Holmes EC, Morens DM, Park EC, Burke DS, Calisher CH, Laughlin CA, Saif LJ, Daszak P. 2008. Cross-species virus transmission and the emergence of new epidemic diseases. *Microbiol Mol Biol Rev* 72: 457-470.
137. Penfold ME, Mocarski ES. 1997. Formation of cytomegalovirus DNA replication compartments defined by localization of viral proteins and DNA synthesis. *Virology* 239: 46-61.
138. Perot K, Walker CM, Spaete RR. 1992. Primary chimpanzee skin fibroblast cells are fully permissive for human cytomegalovirus replication. *J Gen Virol* 73 ( Pt 12): 3281-3284.
139. Petrik DT, Schmitt KP, Stinski MF. 2006. Inhibition of cellular DNA synthesis by the human cytomegalovirus IE86 protein is necessary for efficient virus replication. *J Virol* 80: 3872-3883.
140. Plummer G, Goodheart CR, Henson D, Bowling CP. 1969. A comparative study of the DNA density and behavior in tissue cultures of fourteen different herpesviruses. *Virology* 39: 134-137.
141. Poulin DL, DeCaprio JA. 2006. The carboxyl-terminal domain of large T antigen rescues SV40 host range activity in trans independent of acetylation. *Virology* 349: 212-221.
142. Pyles RB, Sawtell NM, Thompson RL. 1992. Herpes simplex virus type 1 dUTPase mutants are attenuated for neurovirulence, neuroinvasiveness, and reactivation from latency. *J Virol* 66: 6706-6713.

143. Qian Z, Xuan B, Hong TT, Yu D. 2008. The full-length protein encoded by human cytomegalovirus gene UL117 is required for the proper maturation of viral replication compartments. *J Virol* 82: 3452-3465.
144. Rawlinson WD, Farrell HE, Barrell BG. 1996. Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus. *J Virol* 70: 8833-8849.
145. Raynaud J, Atanasiu P, Barreau C, Jahkola M. 1969. [Adaptation of a cytomegalic virus from fieldmice (*Apodemus sylvaticus*) on various heterologous cells, human included]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 269: 104-106.
146. Razonable RR. 2008. Cytomegalovirus infection after liver transplantation: current concepts and challenges. *World J Gastroenterol* 14: 4849-4860.
147. Reboredo M, Greaves RF, Hahn G. 2004. Human cytomegalovirus proteins encoded by UL37 exon 1 protect infected fibroblasts against virus-induced apoptosis and are required for efficient virus replication. *J Gen Virol* 85: 3555-3567.
148. Reddy V, Hao Y, Lipton J, Meharchand J, Minden M, Mazzulli T, Chan C, Messner HA. 1999. Management of allogeneic bone marrow transplant recipients at risk for cytomegalovirus disease using a surveillance bronchoscopy and prolonged pre-emptive ganciclovir therapy. *J Clin Virol* 13: 149-159.
149. Reed JM, Schiff LJ, Shefner AM, Poiley SM. 1975. Murine virus susceptibility of cell cultures of mouse, rat, hamster, monkey, and human origin. *Lab Anim Sci* 25: 420-424.
150. Roizman B, Pellet PE. 2001. The Family Herpesviridae. In Knipe DM, Howley PM (eds.). *Fields Virology*. 4th edn. Lippincott-Williams & Wilkins. Philadelphia.
151. Ryckman BJ, Rainish BL, Chase MC, Borton JA, Nelson JA, Jarvis MA, Johnson DC. 2008. Characterization of the human cytomegalovirus gH/gL/UL128-131 complex that mediates entry into epithelial and endothelial cells. *J Virol* 82: 60-70.
152. Saffert RT, Kalejta RF. 2006. Inactivating a cellular intrinsic immune defense mediated by Daxx is the mechanism through which the human cytomegalovirus pp71 protein stimulates viral immediate-early gene expression. *J Virol* 80: 3863-3871.
153. Salsman J, Zimmerman N, Chen T, Domagala M, Frappier L. 2008. Genome-wide screen of three herpesviruses for protein subcellular localization and alteration of PML nuclear bodies. *PLoS Pathog* 4: e1000100.
154. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. N.Y.
155. Sanchez V, Greis KD, Sztul E, Britt WJ. 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. *J Virol* 74: 975-986.
156. Sandford GR, Schumacher U, Ettinger J, Brune W, Hayward GS, Burns WH, Voigt S. 2009. 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. *J Gen Virol*.
157. Sauter D, et al. 2009. Tetherin-driven adaptation of Vpu and Nef function and the evolution of pandemic and nonpandemic HIV-1 strains. *Cell Host Microbe* 6: 409-421.

- 
158. Scalera NM, Mossad SB. 2009. The first pandemic of the 21st century: a review of the 2009 pandemic variant influenza A (H1N1) virus. *Postgrad Med* 121: 43-47.
  159. Silva MC, Yu QC, Enquist L, Shenk T. 2003. Human cytomegalovirus UL99-encoded pp28 is required for the cytoplasmic envelopment of tegument-associated capsids. *J Virol* 77: 10594-10605.
  160. Sinclair J. 2008. Human cytomegalovirus: Latency and reactivation in the myeloid lineage. *J Clin Virol* 41: 180-185.
  161. Sinclair J, Sissons P. 2006. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J Gen Virol* 87: 1763-1779.
  162. Sinha NK, Roy A, Das B, Das S, Basak S. 2009. Evolutionary complexities of swine flu H1N1 gene sequences of 2009. *Biochem Biophys Res Commun* 390: 349-351.
  163. Sissons JG, Bain M, Wills MR. 2002. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J Infect* 44: 73-77.
  164. Skaletskaya A, Bartle LM, Chittenden T, McCormick AL, Mocarski ES, Goldmacher VS. 2001. A cytomegalovirus-encoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 7829-7834.
  165. Skehel JJ, Wiley DC. 2000. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem* 69: 531-569.
  166. Skeik N, Jabr FI. 2008. Influenza viruses and the evolution of avian influenza virus H5N1. *Int J Infect Dis* 12: 233-238.
  167. Smith CB, Wei LS, Griffiths M. 1986. Mouse cytomegalovirus is infectious for rats and alters lymphocyte subsets and spleen cell proliferation. *Arch Virol* 90: 313-323.
  168. Smith GJ, et al. 2009. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature* 459: 1122-1125.
  169. Smith MG. 1954. Propagation of salivary gland virus of the mouse in tissue cultures. *Proc Soc Exp Biol Med* 86: 435-440.
  170. Söderberg-Naucler C. 2006. Human cytomegalovirus persists in its host and attacks and avoids elimination by the immune system. *Crit Rev Immunol* 26: 231-264.
  171. Spearman C. 1908. The method of "right or wrong" cases (constant stimuli) without Gauss's formula. *British Journal of Psychology*. 2. 227-242.
  172. Steininger C, Puchhammer-Stockl E, Popow-Kraupp T. 2006. Cytomegalovirus disease in the era of highly active antiretroviral therapy (HAART). *J Clin Virol* 37: 1-9.
  173. Stevens J, Blixt O, Tumpey TM, Taubenberger JK, Paulson JC, Wilson IA. 2006. Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. *Science* 312: 404-410.
  174. Tabeta K, et al. 2004. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 3516-3521.

175. Tang Q, Maul GG. 2003. Mouse cytomegalovirus immediate-early protein 1 binds with host cell repressors to relieve suppressive effects on viral transcription and replication during lytic infection. *J Virol* 77: 1357-1367.
176. —. 2006. Mouse cytomegalovirus crosses the species barrier with help from a few human cytomegalovirus proteins. *J Virol* 80: 7510-7521.
177. Tang Q, Li L, Maul GG. 2005. Mouse cytomegalovirus early M112/113 proteins control the repressive effect of IE3 on the major immediate-early promoter. *J Virol* 79: 257-263.
178. Taubenberger JK, Reid AH, Lourens RM, Wang R, Jin G, Fanning TG. 2005. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature* 437: 889-893.
179. Tavalai N, Papior P, Rechter S, Stamminger T. 2008. Nuclear domain 10 components promyelocytic leukemia protein and hDaxx independently contribute to an intrinsic antiviral defense against human cytomegalovirus infection. *J Virol* 82: 126-137.
180. Tavalai N, Papior P, Rechter S, Leis M, Stamminger T. 2006. Evidence for a role of the cellular ND10 protein PML in mediating intrinsic immunity against human cytomegalovirus infections. *J Virol* 80: 8006-8018.
181. Umene K, Sakaoka H. 1999. Evolution of herpes simplex virus type 1 under herpesviral evolutionary processes. *Arch Virol* 144: 637-656.
182. Valchanova RS, Picard-Maureau M, Budt M, Brune W. 2006. Murine cytomegalovirus m142 and m143 are both required to block protein kinase R-mediated shutdown of protein synthesis. *J Virol* 80: 10181-10190.
183. Wagner M, Jonjic S, Koszinowski UH, Messerle M. 1999. Systematic excision of vector sequences from the BAC-cloned herpesvirus genome during virus reconstitution. *J Virol* 73: 7056-7060.
184. Wain LV, et al. 2007. Adaptation of HIV-1 to its human host. *Mol Biol Evol* 24: 1853-1860.
185. Wang F, Ma Y, Barrett JW, Gao X, Loh J, Barton E, Virgin HW, McFadden G. 2004. Disruption of Erk-dependent type I interferon induction breaks the myxoma virus species barrier. *Nat Immunol* 5: 1266-1274.
186. Wang SK, Hu CH, Lu MC, Duh CY, Liao PC, Tyan YC. 2009. Novel virus-associated proteins encoded by UL112-113 of human cytomegalovirus. *J Gen Virol* 90: 2840-2848.
187. Wang X, Huang DY, Huong SM, Huang ES. 2005. Integrin alphavbeta3 is a coreceptor for human cytomegalovirus. *Nat Med* 11: 515-521.
188. Wang X, Huong SM, Chiu ML, Raab-Traub N, Huang ES. 2003. Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature* 424: 456-461.
189. Warming S, Costantino N, Court DL, Jenkins NA, Copeland NG. 2005. Simple and highly efficient BAC recombineering using galK selection. *Nucleic Acids Res* 33: e36.
190. Weiss RA. 2003. Cross-species infections. *Curr Top Microbiol Immunol* 278: 47-71.
191. Weller TH. 1970. Review. Cytomegaloviruses: the difficult years. *J Infect Dis* 122: 532-539.

- 
192. Wiebusch L, Neuwirth A, Grabenhenrich L, Voigt S, Hagemeyer C. 2008. Cell cycle-independent expression of immediate-early gene 3 results in G1 and G2 arrest in murine cytomegalovirus-infected cells. *J Virol* 82: 10188-10198.
  193. Williams BR. 1999. PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene* 18: 6112-6120.
  194. Winkler M, Rice SA, Stamminger T. 1994. UL69 of human cytomegalovirus, an open reading frame with homology to ICP27 of herpes simplex virus, encodes a transactivator of gene expression. *J Virol* 68: 3943-3954.
  195. Wobus CE, Thackray LB, Virgin HWt. 2006. Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. *J Virol* 80: 5104-5112.
  196. Woodhall DL, Groves IJ, Reeves MB, Wilkinson G, Sinclair JH. 2006. Human Daxx-mediated repression of human cytomegalovirus gene expression correlates with a repressive chromatin structure around the major immediate early promoter. *J Biol Chem* 281: 37652-37660.
  197. Wright DA, Spector DH. 1989. Posttranscriptional regulation of a class of human cytomegalovirus phosphoproteins encoded by an early transcription unit. *J Virol* 63: 3117-3127.
  198. Xuan B, Qian Z, Torigoi E, Yu D. 2009. Human cytomegalovirus protein pUL38 induces ATF4 expression, inhibits persistent JNK phosphorylation, and suppresses endoplasmic reticulum stress-induced cell death. *J Virol* 83: 3463-3474.
  199. Yamada S, et al. 2006. Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. *Nature* 444: 378-382.
  200. Yamamoto T, Suzuki S, Radsak K, Hirai K. 1998. The UL112/113 gene products of human cytomegalovirus which colocalize with viral DNA in infected cell nuclei are related to efficient viral DNA replication. *Virus Res* 56: 107-114.
  201. Yu D, Silva MC, Shenk T. 2003. Functional map of human cytomegalovirus AD169 defined by global mutational analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 12396-12401.
  202. Yurochko AD. 2008. Human cytomegalovirus modulation of signal transduction. *Curr Top Microbiol Immunol* 325: 205-220.

## Abkürzungsverzeichnis

AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrom (erworbenes Immundefektsyndrom)	<i>Galk</i>	Galakto-Kinase-Gen
		gB	Glykoprotein B
<i>amp<sup>R</sup></i>	Ampicillinresistenz	GFP	Green Fluorescent Protein (Grün fluoreszierendes Protein)
APS	Ammoniumpersulfat	h	Stunde
BAC	Bacterial Artificial Chromosome (künstliches Bakterienchromosom)	HCMV	Human Cytomegalovirus (humanes Zytomegalievirus)
Bak	Bcl-2 homologous Antagonist Killer	HHV	Humanes Herpesvirus
Bax	Bcl-2 Associated X protein	hIE1	HCMV immediate-early-1 protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2	IE	immediate-early/sehr früh
BclX <sub>L</sub>	Bcl-2 like X protein large	HIV	Human Immunodeficiency Virus (Humanes Immundefizienz Virus)
BSA	Bovines Serum Albumin (Rinderserumalbumin)	hpi	hours post-infection (Stunden nach Infektion)
CMV	Cytomegalovirus (Zytomegalievirus)	HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol	HSV-1	Herpes-Simplex-Virus-1
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	hTERT	humane Telomerase-Reverse-Transkriptase
DMSO	Dimethylsulfoxid	<i>hyg<sup>R</sup></i>	Hygromycin B Resistenz
DNA	Deoxyribonucleic acid (Deoxyribonukleinsäure)	IE	immediate-early
DOG	Deoxy-D-Galaktose	IgG	Immunglobulin G
ds	doublestranded (doppelsträngig)	<i>kan<sup>R</sup></i>	Kanamycinresistenz
dUTP	Deoxy-Uridin-Triphosphat	kb	Kilobasenpaare
E	early/früh	kDa	Kilodalton
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	KSHV	Kaposi-Sarkoma assoziiertes Herpesvirus
EBV	Epstein-Barr-Virus	L	late
EDTA	Ethylendiamtetraessigsäure	LANA2	latency-associated nuclear antigen 2
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor	MCMV	murine Cytomegalovirus (murines Zytomegalievirus)
eIF2 $\alpha$	eukaryontischer Translations-Initiationsfaktor 2 $\alpha$	MCMV/h	an menschliche Zellen adaptiertes MCMV
EtOH	Ethanol	MCMV/ $\Delta$ IE1	MCMV mit Deletion des IE1 Gens (IE1-Deletionsmutante)
Fas	TNF Receptor Superfamily Member 6	MIEP	major-immediate-early-promoter
FKS	Fötales Kälberserum	min	Minuten
FLP	Flippase	miRNA	micro RNA
FRT	FLP Rekombinationstarget	MMuLV	Moloney Murine Leukemia Virus
g	Erdschwerebeschleunigungs-konstante		

MOI	Multiplicity of Infection ("Vielfachheit der Infektion")	TEMED	N, N, N', N'- Tetramethylethylendiamin
mRNA	messenger RNA	TLR	Toll-like Rezeptor
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyltetrazoliumbromid	T <sub>m</sub>	Hybridisierungstemperatur
<i>mut</i>	mutierter Genbereich	TMR	Tetramethyl-Rhodamine
ND10	Nuclear Domain 10	TNF	Tumornekrosis-Faktor
<i>neo</i> <sup>R</sup>	Neomycinresistenz	TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
nt	Nukleotid	ÜN	Über Nacht
OD	Optische Dichte	<i>var</i>	Variante
ORF	Open Reading Frame (offener Leserahmen)	vIBO	viral inhibitor of Bak oligomerization
ori <sub>Lyt</sub>	Lytischer Replikationsursprung	vICA	viral inhibitor of caspase-8 induced apoptosis
PAGE	Poly-Acrylamid-Gel- Elektrophorese	vMIA	viral mitochondria-localized inhibitor of apoptosis
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)	wt	Wildtyp
PCR	Polymerase-Chain-Reaction (Polymerasekettenreaktion)	<i>zeo</i> <sup>R</sup>	Zeocinresistenz
PFA	Paraformaldehyd		
<i>pgk</i>	Phosphoglycerat-Kinase Promotor		
PKR	Proteinkinase R		
PML	promyelocytic leukemia protein		
Rb	Retinoblastom Protein		
RCMV	Rat Cytomegalovirus (Rattenzytomegalievirus)		
<i>Rev</i>	Revertante		
RIP-1	Receptor-Interacting-Protein-1		
RIPA	radio immunoprecipitation buffer		
RNA	Ribonukleinsäure		
SDS	Sodium Lauryl Sulfate (Natriumlaurylsulfat)		
shRNA	small hairpin RNA		
siRNA	small interfering RNA		
SSC	Sodium citrate/Sodium chloride (Natriumcitrat/Natriumchlorid- Lösung)		
TAE	Tris/Acetate/EDTA-Puffer		
TBE	Tris/Borat/EDTA-Puffer		
TCID	"tissue culture infection dose"		
TdT	terminale Desoxyribo- nukleotidyl-Transferase		

## **Curriculum Vitae**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wurde der Inhalt des Lebenslaufes entfernt.

---

## Präsentationen und Kongressbesuche

### Vorträge

- 09/2009 4. „Mini-Herpesvirus Workshop“, Berlin  
**Molecular mechanisms of the Murine Cytomegalovirus Species Specificity**  
Uwe Schumacher, Igor Jurak, Wolfram Brune
- 10/2008 7. Workshop „Cell Biology of Viral Infections“, Deidesheim  
**The Murine Cytomegalovirus m38.5 Protein Inhibits Bax-Mediated Cell Death**  
Uwe Schumacher, Igor Jurak, Wolfram Brune
- 03/2008 18. Jährliche Tagung der „Gesellschaft für Virologie“, Heidelberg  
**The Murine Cytomegalovirus m38.5 Protein Inhibits Bax-Mediated Cell Death**  
Uwe Schumacher, Igor Jurak, Wolfram Brune

### Poster

- 05/2009 „12th International Cytomegalovirus/ $\beta$ -Herpesvirus-Workshop“,  
Boston, USA  
**The Murine Cytomegalovirus m38.5 Protein Inhibits Bax-Mediated Cell Death**  
Uwe Schumacher, Igor Jurak, Maren Çam, Wolfram Brune

### Besuchte Tagungen/Kongresse

- 09/2008 3. „Mini-Herpesvirus Workshop“, Berlin  
07/2007 2. „Mini-Herpesvirus Workshop“, Berlin  
10/2007 Symposium „Cytomegalovirus“, Budenheim bei Mainz  
09/2006 1. „Mini-Herpesvirus Workshop“, Berlin

## Publikationen

**Uwe Schumacher, Igor Jurak, Wolfram Brune.**

Mutations in the M112/M113 coding region facilitate murine cytomegalovirus replication in human cells.

eingereicht bei *J Virol*.

**Sandford GR, Schumacher U, Ettinger J, Brune W, Hayward GS, Burns WH, Voigt S.**

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.

*J Gen Virol*. 2009 Nov 18. [Epub ahead of print]

**Kim OB, Reimann J, Lukas H, Schumacher U, Grimpo J, Dünwald P, Uden G.**

Regulation of tartrate metabolism by TtdR and relation to the DcuS-DcuR-regulated C4-dicarboxylate metabolism of *Escherichia coli*.

*Microbiology*. 2009 Nov;155(Pt 11):3632-40.

**Jurak I, Schumacher U, Simic H, Voigt S, Brune W.**

Murine cytomegalovirus m38.5 protein inhibits Bax-mediated cell death.

*J Virol*. 2008 May;82(10):4812-22.

**Danksagung**

Herrn PD Dr. W. Brune danke ich für die Überlassung dieser interessanten Themenstellung und die ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Sein Engagement war eine große Hilfe bei der Durchführung dieser Arbeit im Labor.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. R. Mutzel und Frau PD Dr. A. Mankertz für die Betreuung meiner Dissertation und für die Erstellung der Gutachten.

Weiterhin danke ich Dr. I. Jurak, der die für diese Arbeit grundlegende Beobachtungen gemacht und an mich weitergegeben hat.

Meinen jetzigen und ehemaligen Kollegen am Robert-Koch-Institut danke ich für die freundliche und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre. Insbesondere Danke ich hierbei W. Handke und S. Stahl.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Mutter. Sie hat durch ihre Unterstützung, ihre Hilfsbereitschaft und den Glauben an mich einen entscheidenden Beitrag zum erfolgreichen Abschluss der Dissertation beigetragen.

Meinen langjährigen Freunden und den „neuen“ Freunden aus Berlin möchte ich, vor allem für den vielen Spaß, den wir zusammen hatten, aber auch für die moralische Unterstützung bei so manchem Tief, herzlich danken. Ihr seid super! Hierbei bedanke ich mich ganz besonders bei Udo Raaf, Anne Wolbert, Jenny Bender, Clemens Nessler und bei Lola und Paul.

**Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Uwe Schumacher, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und nur die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Diese Arbeit wurde bislang noch nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht oder veröffentlicht.

Berlin, im Januar 2010