

In vivo konditionale Depletion von latentem murinen Cytomegalovirus

Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg–Universität Mainz

Sabine Scheller
geb. am 30.09.1980 in Ludwigshafen/Rh.

Mainz, August 2011

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Januar 2012

*So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig,
man muß sie für fertig erklären,
wenn man nach Zeit und Umständen
das mögliche getan hat.*

J. W. von Goethe, „Italiänische Reise“, 16. März 1787

Zusammenfassung

Die Lunge stellt einen Hauptort der CMV-Latenz dar. Die akute CMV-Infektion wird durch infiltrierende antivirale CD8 T-Zellen terminiert. Das virale Genom verbleibt jedoch im Lungengewebe in einem nicht replikativen Zustand, der Latenz, erhalten. Es konnte bereits gezeigt werden, dass während der Latenz die *Major Immediate Early-* (MIE) Gene *ie1-* und *ie2* sporadisch transkribiert werden. Bisher konnte diese beginnende Reaktivierung latenter CMV-Genome nur in einer Momentaufnahme gezeigt werden (Kurz *et al.*, 1999; Grzimek *et al.*, 2001; Simon *et al.*, 2005; zur Übersicht: Reddehase *et al.*, 2008). Die sporadische Expression der MIE-Gene führt jedoch zur Präsentation eines antigenen IE1-Peptids und somit zur Stimulation antiviraler IE1-Peptid-spezifischer CD8 T-Zellen, die durch ihre Effektorfunktion die beginnende Reaktivierung wieder beenden. Dies führte uns zu der Hypothese, dass MIE-Genexpression über einen Zeitraum betrachtet (*period prevalence*) häufiger stattfindet als es in einer Momentaufnahme (*point prevalence*) beobachtet werden kann.

Um die Häufigkeit der MIE-Genexpression in der Dynamik in einem definierten Zeitraum zu erfassen, sollte eine Methode entwickelt werden, welche es erstmals ermöglicht, selektiv und konditional transkriptionell aktive Zellen sowohl während der akuten Infektion als auch während der Latenz auszulöschen. Dazu wurde mit Hilfe der Zwei-Schritt BAC-Mutagenese ein rekombinantes *death-tagged* Virus hergestellt, welches das Gen für den Diphtherie Toxin Rezeptor (DTR) unter Kontrolle des *ie2*-Promotors (P²) enthält. Ist der P² transkriptionell aktiv, wird der DTR an der Zelloberfläche präsentiert und die Zelle wird suszeptibel für den Liganden Diphtherie Toxin (DT). Durch Gabe von DT werden somit alle Zellen ausgelöscht, in denen virale Genome transkriptionell aktiv sind. Mit zunehmender Dauer der DT-Behandlung sollte also die Menge an latenten viralen Genomen abnehmen.

In Western Blot-Analysen konnte das DTR-Protein bereits 2h nach der Infektion nachgewiesen werden. Die Präsentation des DTR an der Zelloberfläche wurde indirekt durch dessen Funktionalität bewiesen. Das rekombinante Virus konnte in Fibroblasten in Gegenwart von DT nicht mehr replizieren. In akut infizierten Tieren konnte die virale DNA-Menge durch eine einmalige intravenöse (i.v.) DT-Gabe signifikant reduziert werden. Verstärkt wurde dieser Effekt durch

eine repetitive i.v. DT-Gabe. Auch während der Latenz gelang es, die Zahl der latenten viralen Genome durch repetitive i.v. und anschließende intraperitoneale (i.p.) DT-Gabe zu reduzieren, wobei wir abhängig von der Dauer der DT-Gabe eine Reduktion um 60% erreichen konnten. Korrespondierend zu der Reduktion der DNA-Menge sank auch die Reaktivierungshäufigkeit des rekombinanten Virus in Lungenexplantatkulturen.

Um die Reaktivierungshäufigkeit während der Latenz berechnen zu können, wurde durch eine Grenzverdünnungsanalyse die Anzahl an latenten viralen Genomen pro Zelle bestimmt. Dabei ergab sich eine Kopienzahl von 9 (6 bis 13). Ausgehend von diesen Ergebnissen lässt sich berechnen, dass, bezogen auf die gesamte Lunge, in dem getesteten Zeitraum von 184h durch die DT-Behandlung 1.000 bis 2.500 Genome pro Stunde ausgelöscht wurden. Dies entspricht einer Auslöschung von 110 bis 280 MIE-Gen-exprimierenden Lungenzellen pro Stunde. Damit konnte in dieser Arbeit erstmals die Latenz-assoziierte Genexpression in ihrer Dynamik dargestellt werden.

Summary

The lungs are a main target organ of CMV latency. The acute CMV infection is terminated by infiltrating antiviral CD8 T cells. The viral genome remains in lung tissue in a non-replicative state called latency. We could already show that the Major Immediate Early (MIE) genes *ie1* and *ie2* are sporadically transcribed during latency. Until now the beginning reactivation of latent CMV-genomes could only be shown for a certain time point (Kurz *et al.*, 1999; Grzimek *et al.*, 2001; Simon *et al.*, 2005; for review: Reddehase *et al.*, 2008).

However, the sporadic expression of MIE genes leads to the presentation of an antigenic IE1-peptide and consequently to the stimulation of antiviral IE1-peptide specific CD8 T cells, which terminate the beginning reactivation by their effector function (Simon *et al.*, 2006a). This leads us to the hypothesis that MIE gene expression in a time interval (period prevalence) is a more frequent event than it could be monitored for a certain time point (point prevalence). To acquire the MIE gene expression in its dynamic over a defined period of time a method should be developed to selectively and conditionally deplete transcriptionally active cells in the acute infection as well as during latency, for the first time. Using the two-step BAC mutagenesis technique, a death-tagged recombinant virus was constructed which includes the gene for the diphtheria toxin receptor (DTR) under the control of the *ie2*-promoter (P^2). If P^2 is transcriptionally active the DTR is presented on the cell surface and the cells become susceptible for the ligand diphtheria toxin (DT). As a consequence, all cells will be depleted by DT where viral genomes are transcriptionally active. With increasing time of DT treatment the amount of latent viral genomes should be reduced.

Western Blot analysis verified expression of the DTR protein 2h post infection. The presentation of the DTR on the cell surface was proved indirectly by its functionality. The recombinant virus failed to replicate in fibroblasts in the presence of DT. In acutely infected animals the amount of viral DNA could be significantly reduced by a single intravenous (i.v.) DT application. This effect was improved by a repetitive i.v. DT treatment. Also during latency we successfully reduced the amount of latent viral genomes by a repetitive i.v. DT application followed by intraperitoneal (i.p.) DT application, where we reached a reduction of 60% dependent on the period of DT

treatment. Corresponding to the DNA amount reduction, the frequency of reactivation of the recombinant virus in lung explant cultures was also reduced.

To calculate the reactivation frequency during latency we had to determine the number of latent viral genomes per cell with the help of a limiting dilution analysis. This results in a copy number of 9 (6 to 13). Based on these results we could demonstrate that, related to the whole lung, in the tested time period of 184 hours about 1,000 to 2,500 genomes per hour were reduced by DT. This corresponds to a depletion of 110 to 280 MIE gene expressing lung cells per hour. So in this work we demonstrated for the first time the latency associated gene expression in its dynamic.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	i
Summary	iii
Inhaltsverzeichnis	v
Abkürzungsverzeichnis	xiii
1 Einleitung	1
1.1 Klassifizierung der Herpesviren	1
1.2 Eigenschaften der Cytomegaloviren	2
1.2.1 Morphologie des CMV-Virions	3
1.2.2 Genomstruktur	4
1.2.3 Penetration der Wirtszelle	4
1.3 Die akute CMV-Infektion	5
1.3.1 Genexpression und CMV-Replikation	5
1.3.2 Organtropismus der akuten CMV-Infektion	7
1.3.3 Kontrolle der CMV-Infektion durch das Immunsystem	8
1.4 Die latente CMV-Infektion	9
1.4.1 Virale Genexpression während der Latenz	10
1.4.2 Latenzort von CMV	11
1.4.3 Kontrolle der CMV-Latenz durch CD8 T-Zellen	12
1.4.4 Reaktivierung	13
1.5 Klinische Relevanz der CMV-Infektion	14

1.5.1	Pathogenese der CMV-Infektion	15
1.5.2	Die mCMV-Infektion der Maus als Modellsystem für eine hCMV-Infektion	16
1.6	Struktur des Diphtherie Toxins	17
1.7	Der Diphtherie Toxin Rezeptor	18
1.8	Wirkmechanismus von Diphtherie Toxin	21
1.9	Das <i>ie2</i> -Gen als Integrationsort des <i>DTR</i> -Gens	22
1.10	Zielsetzung	23
2	Material und Methoden	25
2.1	Allgemeine Laborgeräte und Reagenzien	25
2.1.1	Allgemeine Laborgeräte	25
2.1.2	Plastikwaren und Verbrauchsmaterialien	26
2.1.3	Chemikalien	28
2.1.4	Zellkulturmedien und Medienzusätze	30
2.1.5	Verwendete Antikörper	31
2.1.6	Enzyme	32
2.1.7	Kits	33
2.1.8	Verwendete Oligonukleotide	33
2.1.9	Verwendete Vektorsysteme und Plasmide	37
2.2	Zellbiologische Methoden	38
2.2.1	Verwendete Zellen und Zelllinien	38
2.2.1.1	COS-7	38
2.2.1.2	Murine Embryofetale Fibroblasten	39
2.2.2	Anlage von MEF-Kulturen	39
2.2.3	Kryokonservierung und Reaktivierung von Zellen	40
2.2.4	Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität	41
2.2.5	Rekonstitution von Viren	41
2.2.5.1	Transfektion von Säugerzellen mit Dendrimeren	41
2.2.5.2	Transfektion von BAC-Plasmid-DNA	42
2.2.6	DT-Behandlung von infizierten MEF	42

2.2.7	Cytofluorometrische Methoden	43
2.2.7.1	Apoptosemessung durch Annexin V und 7-AAD Färbung	43
2.2.7.2	Infektion und Färben der Zellen	44
2.2.8	Herstellung einer Einzelzellsuspension aus Lungenzellen	45
2.3	Virologische Methoden	46
2.3.1	Verwendete Viren	46
2.3.2	Eliminierung von BAC-Sequenzen aus rekombinanten mCMV	47
2.3.3	mCMV-Produktion	48
2.3.4	mCMV-Titerbestimmung	50
2.3.4.1	Virustiterbestimmung aus Zellkulturüberständen	50
2.3.4.2	Virustiterbestimmung aus Organhomogenaten	51
2.3.5	Zentrifugale Infektion von MEF	51
2.4	Molekularbiologische Methoden	51
2.4.1	Verwendete Bakterienstämme	51
2.4.2	Bakterienanzucht	52
2.4.2.1	Flüssigkulturen	52
2.4.2.2	Plattenkulturen	53
2.4.2.3	Dauerkulturen	53
2.4.3	Transformation kompetenter Bakterienzellen	53
2.4.3.1	Herstellung elektrokompetenter Bakterien	53
2.4.3.2	Elektrotransformation	54
2.4.3.3	Elektrotransformation von BAC-Plasmiden	54
2.4.4	Isolierung von DNA	55
2.4.4.1	Schnellpräparation von Plasmid-DNA	55
2.4.4.2	Schnellpräparation von BAC-Plasmid-DNA	56
2.4.4.3	QIAprep Spin Miniprep	57
2.4.4.4	QIAGEN Plasmid-Maxipräparation	57
2.4.4.5	BAC-Plasmid-Maxipräparation	58
2.4.4.6	DNA-Isolierung aus Organen, Zellen und Geweben	58

2.4.4.7	Isolierung viraler und zellulärer Nukleinsäuren aus Virusüberständen	59
2.4.4.8	Präzipitation von Nukleinsäuren	59
2.4.5	Isolierung von RNA	60
2.4.5.1	RNA-Isolierung aus Organen	60
2.4.5.2	RNA-Isolierung aus Zellen	61
2.4.6	Quantifizierung von Nukleinsäure-Proben	61
2.4.7	Restriktion	61
2.4.8	Native Gelelektrophorese von DNA	62
2.4.9	Elution von DNA aus Agarosegelen	63
2.4.10	Aufreinigung von PCR-Produkten	64
2.4.11	Dephosphorylierung linearer DNA	64
2.4.12	Ligation von DNA-Fragmenten	65
2.4.13	Die PCR	66
2.4.14	qPCR	68
2.4.14.1	Absolute Quantifizierung	69
2.4.14.2	Absolute Quantifizierung mit SYBR GreenI	69
2.4.14.3	Absolute Quantifizierung mit <i>TaqMan</i> TM -Sonde	71
2.4.15	Reverse Transkriptase-PCR	72
2.4.15.1	Relative Quantifizierung von Transkriptmengen mit <i>TaqMan</i> TM -Sonde	72
2.4.15.2	Herstellung des DTR <i>in vitro</i> -Transkripts	73
2.4.15.3	Absolute Quantifizierung von Transkriptmengen durch RT-qPCR	74
2.4.16	Herstellung rekombinanter mCMV mittels BAC-Technologie	75
2.4.16.1	Mutagenese mittels Zwei-Schritt Rekombinationsverfahren	75
2.4.16.2	Mutagenese mittels Ein-Schritt Rekombinationsverfahren	77
2.5	Histologische Methoden	79
2.5.1	Formalin-Fixierung und Einbetten der Organe	79
2.5.2	Anfertigung von histologischen Schnitten	80
2.5.3	Deparaffinierung und Rehydratisierung der Schnitte	81

2.5.4	mCMV-IE1-spezifische Immunhistochemie	81
2.6	Biochemische Methoden	84
2.6.1	Gesamtproteinextraktion aus transfizierten bzw. infizierten Zellen	84
2.6.2	Proteinquantifizierung	84
2.6.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	85
2.6.4	Western Blot	86
2.6.5	Detektion der Proteine	87
2.6.6	Coomassie-Färbung der PVDF-Membran	88
2.6.7	Serumaufreinigung über Peptidsäulen	88
2.6.8	Immunfluoreszenz	89
2.7	Tierexperimentelle Methoden	90
2.7.1	Verwendete Versuchstiere	90
2.7.2	Immunsuppression	91
2.7.3	Intraplantare Infektion der BALB/c-Maus	91
2.7.4	i.v. und i.p. Injektion von DT	91
2.7.5	Organentnahme und Probenkonservierung	91
2.7.6	Experimentelle Knochenmarktransplantation und mCMV-Infektion	92
2.7.6.1	Isolierung von Knochenmarkzellen	92
2.7.6.2	Bestrahlung der Rezipienten, KMT und Infektion	92
3	Ergebnisse	93
3.1	Zwei-Schritt BAC-Mutagenese zur Insertion des simian <i>DTR</i> -Gens in das mCMV-Genom	94
3.1.1	Herstellung des <i>shuttle</i> -Plasmids pST76K_SR_ΔIE2DTR	94
3.1.2	Charakterisierung des <i>shuttle</i> -Plasmids	98
3.2	Herstellung und Charakterisierung rekombinanter mCMV-BAC-DTR-Plasmide	100
3.2.1	Herstellung rekombinanter mCMV-BAC-DTR-Plasmide	100
3.2.2	Restriktionsenzymverdau der rekombinanten mCMV-BAC-DTR-Plasmide	101
3.2.3	Sequenzanalyse der rekombinanten BAC-Plasmide mCMV-BAC_ΔIE2DTR und mCMV-BAC-IE1L176A_ΔIE2DTR	103

3.3	Ein-Schritt BAC-Mutagenese zur HA-Epitop-Markierung des DTR	105
3.3.1	Entfernung des Selektionsmarkers nach der Mutagenese	108
3.3.2	Restriktionsanalyse des rekombinanten mCMV-BAC_ΔIE2DTR-HA	108
3.3.3	Sequenzanalyse des rekombinanten mCMV-BAC_ΔIE2DTR-HA	110
3.4	Herstellung rekombinanter mCMV aus BAC-Plasmiden	111
3.4.1	Exzision der BAC-Sequenzen	112
3.4.2	Quantifizierung von BAC-Sequenzen aus Überständen rekonstituierter mCMV-Rekombinanten	112
3.5	Charakterisierung rekombinanter mCMV in Zellkultur	113
3.5.1	Nachweis des DTR-Proteins im Western Blot	114
3.5.1.1	Herstellung des Expressionsplasmids pcDNA3.1/ <i>myc</i> -HisA_DTR114	
3.5.1.2	Nachweis des DTR-Proteins	116
3.5.2	Nachweis des DTR durch HA-Epitop-Markierung	118
3.5.3	Überprüfung der IE2-Proteinexpression	119
3.5.4	Bestimmung des Genom-zu-PFU-Verhältnisses	120
3.5.5	<i>In vitro</i> -Replikationskinetik rekombinanter Viren	121
3.5.6	Funktioneller Nachweis des DTR	123
3.5.6.1	Dosis-Wirkungs-Kurve für DT auf MEF	123
3.5.6.2	Replikationskinetik unter DT-Gabe	125
3.5.6.3	DT-Stabilität in Zellkulturmedium	126
3.5.6.4	Hemmung der Proteinsynthese durch DT	128
3.5.6.5	Nachweis der DT-induzierten Apoptose	131
3.6	Charakterisierung der rekombinanten Viren <i>in vivo</i>	135
3.6.1	Quantifizierung der Virusreplikation in Lunge, Milz und Speicheldrüse mittels Plaque-Assay	136
3.6.2	Quantifizierung der Virusreplikation durch IE1-spezifische IHC der Leber	138
3.7	Konditionale Depletion von Virusgenomen durch DT in akut infizierten Mäusen	140
3.7.1	Vergleichende Analyse der DT-Applikation i.p. versus i.v.	141
3.7.2	Bestimmung der optimalen DT-Konzentration <i>in vivo</i>	144
3.7.3	Bestimmung des optimalen Zeitpunkts der DT-Applikation	146

3.7.4	Reduktion der viralen DNA-Load durch repetitive DT-Applikation	148
3.8	Konditionale Depletion von latenten Virusgenomen durch DT in latent infizierten Mäusen	154
3.8.1	Überprüfung der Latenz von mCMV-IE1L176A_ΔIE2DTR	154
3.8.2	Quantifizierung von IE-Transkripten aus Lungenstücken latent infizierter Mäuse	155
3.8.2.1	Herstellung des DTR <i>in vitro</i> -Transkripts	155
3.8.2.2	Quantifizierung von <i>IE1</i> - und <i>DTR</i> -Transkripten	156
3.8.3	Konditionale Depletion von latenten mCMV-Genomen durch repetitive DT-Behandlung	158
3.8.4	Virusreaktivierung aus Lungenstücken latent infizierter Mäuse	164
3.8.5	Abschätzung der Reaktivierungshäufigkeit latenter viraler Genome in latent infizierten Lungen	165
3.8.5.1	Bestimmung der Frequenz latent infizierter Lungenzellen	165
3.8.5.2	Berechnung der Reaktivierungshäufigkeit	167
4	Diskussion	169
4.1	Insertion des simian <i>DTR</i> -Gens in das mCMV-Genom	169
4.2	Der DTR wird unter IE-Bedingungen exprimiert	171
4.3	Insertion des simian <i>DTR</i> -Gens in das mCMV-Genom hat keine Auswirkungen auf die virale Replikation <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	172
4.4	Dosis-abhängige Inhibition der Virusreplikation durch DT <i>in vitro</i>	173
4.5	DT inhibiert die Proteinsynthese und die Zelle stirbt einen apoptotischen Tod	174
4.6	Wahl der optimalen Injektionsroute für DT bei akut infizierten Tieren	177
4.7	Wahl der optimalen DT-Konzentration und des optimalen Zeitpunkts der DT-Applikation in akut infizierten Tieren	179
4.8	Menge latenter mCMV-Genome in Lungenzellen	182
4.9	Berechnung der Reaktivierungshäufigkeit latenter mCMV-Genome in der Lunge	183
4.10	Eine Reduktion der viralen DNA-Load durch DT verringert das Risiko der Virusreaktivierung	186
4.11	Fazit und Ausblick	187

Literaturverzeichnis	189
A Sequenzen, Plasmidkarten und Original-Versuchsdaten	213
A.1 Plasmidkarte A) Zwischenkonstrukt pST76K_SRie1/3-ie2 und B) <i>shuttle</i> - Plasmid pST76K_SR_ΔIE2DTR	213
A.2 Sequenzausschnitt mCMV_ΔIE2DTR	214
A.3 Sequenzausschnitt mCMV_ΔIE2DTR-HA	215
A.4 Klonierung des pSP64PolyA ⁺ _DTR	216
A.5 Virusreaktivierung aus Lungenexplantatkulturen	217
Poster und Vorträge	219
Eidesstattliche Versicherung	221

Abkürzungsverzeichnis

A	
α (Präfix)	<i>anti/alpha</i>
7-AAD	7-Amino-Actinomycin D
ADP	Adenosindiphosphat
ADPR	ADP-Ribose
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
<i>Aqua bidest</i> . .	Reinstwasser (<i>Aqua ad iniectabilia</i>)
AS	Aminosäure
ATCC	<i>american type culture collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat

B	
β	<i>beta</i>
β -ME	β -Mercaptoethanol
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
BCA	Bicinchonimin-Säure
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
Z	Verdopplungszeiten

C	
Cam	Chloramphenicol
C	C-terminal
CCIC	<i>circulating cytomegalic infected cells</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CIP	<i>calf intestinal phosphatase</i>

CMV	Cytomegalovirus
Cs	Cäsium
CSF	<i>colony stimulating factor</i>
C _T	<i>threshold cycle</i>
CTL	<i>cytolytic T lymphocytes</i> (cytolytische T-Lymphocyten)
CTP	Cytidintriphosphat

D

DAB	Diaminobenzidin
DB	<i>dense body</i>
DC	<i>dendritic cell</i> (dendritische Zelle)
DL	Detektionslimit (Nachweisgrenze)
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxiribonukleotidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DT	Diphtherie Toxin
DTR	Diphtherie Toxin Rezeptor
DTT	1,4-Dithiothreitol

E

<i>e</i>	<i>early</i> Gen
<i>E</i>	<i>early</i> Transkript
E	<i>early</i> Protein/ <i>early</i> Phase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EBV	Epstein-Barr Virus
EF2	Elongationsfaktor-2
EGFR	<i>epidermis growth faktor receptor</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Ex	Extinktion

F

FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
for	<i>forward</i>
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
FSC	<i>forward scatter</i>

G

gB	Glykoprotein B
GBSS	<i>Gey's balanced salt solution</i>
GITC	Guanidin-Isothiocyanat
Glu	Glutaminsäure
GM	Granulocyten-Makrophagen
GTP	Guanosintriphosphat
GvHD	<i>graft versus host disease</i>
Gy	Gray

 H

H ₂ O _{demin}	Demineralisiertes Wasser
HA	Hämagglutinin
HB-EGF	<i>heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor</i>
hCMV	humanes Cytomegalovirus
HDAC	Histondeacetylase
HHV	Humanes Herpesvirus
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HRP	<i>horse reddish peroxidase</i>
HSCT	<i>hematopoietic stem cell transplantation</i>
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykan
HSV	Herpes Simplex Virus
Hz	Hertz

 I

<i>ie</i>	<i>immediate early</i> Gen
<i>IE</i>	<i>immediate early</i> Transkript
IE	<i>immediate early</i> Protein/ <i>immediate early</i> Phase
IF	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
Ile	Isoleucin
INM	<i>inner nuclear membrane</i>
i.p.	intraperitoneal
i.f.	intraplantar (footpad)
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös

 K

KAc	Kaliumacetat
Kan	Kanamycin
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KMT	Knochenmarktransplantation
KMZ	Knochenmarkzellen
KSHV	Kaposi-Sarkom-assoziiertes Herpesvirus
kV	Kilovolt

 L

<i>I</i>	<i>late</i> Gen
<i>L</i>	<i>late</i> Transkript
L	<i>late</i> Protein/ <i>late</i> Phase
LB	Luria-Bertani Medium
Leu	Leucin
LK	Lymphknoten
l	Liter
LSEC	<i>liver sinusoidal endothelial cell</i>
Lys	Lysin

 M

mAk	monoklonaler Antikörper
MC	Methylcellulose-Medium
mCMV	murines Cytomegalovirus
MCP	<i>major capsid protein</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MEF	Murine embryofetale Fibroblasten
MEM	<i>minimum essential medium</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MIE	<i>major immediate early</i>
MIE-PEEP	<i>major immediate early promoter enhancer-enhancer promoter</i>
M	Molar
MM	molekulare Masse
mM	Millimol
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MP	Magermilchpulver
MPN	<i>most probable number</i>

 N

NAD⁺ Nicotinamidadenindinukleotid
 NEB New England Biolabs
 NIEP *non-infectious enveloped particle*
 n.i. nicht infiziert
 NK natürliche Killer (zellen)
 N N-terminal
 NS Normal-Serum

 O

OD optische Dichte
 ONM *outer nuclear membrane*
 ORF *open reading frame*

 P

p.A. *pro analysis*
 PAGE Polyacrylamid-Gelelektrophorese
 pAk polyklonaler Antikörper
 PBS *phosphate buffered saline*
 PCR *polymerase chain reaction*
 PEG Polyethylenglycol
 PE Phycoerythrin
 PFA Paraformaldehyd
 PFU *plaque forming unit*
 Phe Phenylalanin
 p.i. post Infektion
 PI Protease Inhibitor
 PM Plasmamembran
 P Promotor
 P/S Penicillin/Streptomycin
 PS Phosphatidylserin
pthrp *(murine) parathyroid hormone-related peptide-encoding gene*
 PVDF Polyvenyliden Fluorid

 Q

qPCR quantitative PCR

 R

Res Resistenz
 rev *reverse*

RT-PCR Reverse Transkriptase PCR
 RT-qPCR quantitative RT-PCR
 RT Raumtemperatur

 S

SCID *severe combined immunodeficiency*
 SDS sodium dodecyl sulfat
 sec Sekunde
 SPF *specified pathogen free*
 SSC *side scatter*
 ssDNA *single stranded RNA*
 SV sekretorische Vesikel

 T

$T_{1/2}$ Halbwertszeit
 TAE Tris-Acetat-EDTA
Taq *Thermus aquaticus*
 TBE Tris-Borat-EDTA
 TBS *Tris buffered saline*
 TCR *T cell receptor*
 TEMED N,N,N',N'-Tetraethyl-methylendiamin
 T_{EM} *effector-memory* T-Zelle
 TE Tris-EDTA
 TF Transkriptionsfaktor
 TFBS TF-Bindungsstelle
 TGN trans-Golgi-Netzwerk
 TNF Tumor Nekrose Faktor
 Tris Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
 TSA Trichostatin A

 U

üN über Nacht
 UTP Uridintriphosphat
 U Unit

 V

VSP Virus-Standard-Puffer
 V Volt
 v *volume*

VZV Varicella Zoster Virus

VZ Verdopplungszeiten

W

WB Western Blot

WT Wildtyp

w *weight*

Z

ZVTE zentrale Versuchstiereinrichtung

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Klassifizierung der Herpesviren

Die Familie der *Herpesviridae* ist in der Natur ubiquitär verbreitet und umfasst derzeit acht humanpathogene (HHV1-HHV8, s. Tab. 1.1), sowie über 100 tierpathogene Erreger. Die Zuordnung einzelner Viren zu den *Herpesviridae* erfolgt in erster Linie anhand der charakteristischen Architektur des Viruspartikels (Plummer, 1967; zur Übersicht: Roizman *et al.*, 1992). Allen Herpesviren gemein ist die Fähigkeit zur Etablierung einer lebenslangen Latenz, d.h. dass nach einer Primärinfektion die virale DNA ruhend im Organismus verbleibt. Unter Immunsuppression kann die DNA transkriptionell reaktivieren und eine produktive Infektion induzieren (Roizman und Baines, 1991; Reddehase *et al.*, 2008).

Tab. 1.1: Humanpathogene Herpesviren (HHV)

Unterfamilie	Genus	Virus	Synonym	Referenz
<i>α-Herpesvirinae</i>	Simplexvirus	HHV-1	Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1)	Gruter, 1924
		HHV-2	Herpes Simplex Virus 2 (HSV-2)	Schneweis, 1962
	Varicellovirus	HHV-3	Varicella Zoster Virus (VZV)	Dumas <i>et al.</i> , 1980
<i>β-Herpesvirinae</i>	Cytomegalovirus (CMV)	HHV-5	humanes Cyto- megalovirus (hCMV)	Smith, 1956
	Roseolovirus	HHV-6		Lindquester und Pellett, 1991
		HHV-7		Frenkel <i>et al.</i> , 1990

Unterfamilie	Genus	Virus	Synonym	Referenz
γ - <i>Herpesvirinae</i>	Lymphocryptovirus	HHV-4	Epstein-Barr Virus (EBV)	Epstein <i>et al.</i> , 1965
	Rhadinovirus	HHV-8	Kaposi-Sarkom- assoziiertes Herpesvirus (KSHV)	Chang <i>et al.</i> , 1994

(Verändert nach van Regenmortel *et al.*, 2000)

Die *Herpesviridae* werden entsprechend ihrer biologischen Eigenschaften, die sich auf das Wirtsspektrum, die Dauer des Replikationszyklus, sowie die Cytopathologie und den Ort ihrer Persistenz beziehen, in die drei Unterfamilien α -, β -, und γ -*Herpesvirinae* eingeteilt (Roizman *et al.*, 1992).

Die α -*Herpesvirinae* zeichnen sich durch ein breites Wirtsspektrum, sowie einen kurzen Replikationszyklus aus. *In vivo* sind sie neurotrop und persistieren in sensorischen Ganglien. Die β -*Herpesvirinae* können verschiedene Zelltypen und Gewebe in ihrem natürlichen Wirt infizieren, sind aber hoch Spezies-spezifisch, d.h. Zellen von entfernten Spezies sind nicht permissiv für eine produktive Infektion (Weller, 1970; Schumacher *et al.*, 2010). Natürliche Mutationen in der *M112/M113*-Genregion des murinen Cytomegalovirus (mCMV) können jedoch dazu beitragen, dass mCMV schnell und mit hohen Virustitern in humanen Zellen replizieren können (Schumacher *et al.*, 2010). Im Gegensatz zu α -*Herpesvirinae* zeigen β -*Herpesvirinae* einen langsamen Replikationszyklus. Auch die γ -*Herpesvirinae* zeichnen sich durch ein limitiertes Wirtsspektrum aus. Sie infizieren und etablieren Latenz vorwiegend in B- und T-Lymphocyten (Pellett und Roizman, 2007).

1.2 Eigenschaften der Cytomegaloviren

Die Virionen der Cytomegaloviren (s. Abb. 1.1) zeigen die typische Morphologie eines Mitglieds der *Herpesviridae*. Die Cytomegaloviren (human: hCMV und murin: mCMV) gehören zur Unterfamilie der β -*Herpesvirinae*. Es handelt sich dabei um große DNA-Viren mit einer Kodierungskapazität von etwa 165 bis 170 Proteinen. Die typische, mit Einschlusskörpern verbundene Vergrößerung der infizierten Zellen (Cytomegalie) war namensgebend für die Gruppe der Cytomegaloviren (Weller *et al.*, 1960).

1.2.1 Morphologie des CMV-Virions

Der Durchmesser eines reifen CMV-Virions beträgt 150nm bis 200nm. Ein Virion besteht aus dem linearen DNA-Genom, welches mit fibrillären Proteinen assoziiert vorliegt. Das virale Genom ist umgeben von einem ikosaedrisch geformten Nukleokapsid, das einen Durchmesser von etwa 100nm hat. Es setzt sich aus 162 Kapsomeren zusammen (Chen *et al.*, 1999) und ist von einer amorphen Proteinmatrix, dem Tegument, umgeben, das aus ungefähr 25 verschiedenen viralen Proteinen besteht. Nach außen ist das Virion durch eine etwa 11nm dicke Lipidhülle (*envelope*) zellulären Ursprungs umgeben (Tooze *et al.*, 1993), in die virale und zelluläre Glykoproteine eingelagert sind (Strelow *et al.*, 2006; Mocarski *et al.*, 2007). Diese viralen Glykoproteine vermitteln die virale Anheftung (*attachment*) an der Wirtszelle, sowie die Penetration durch pH-unabhängige Membranfusion (Compton *et al.*, 1992).

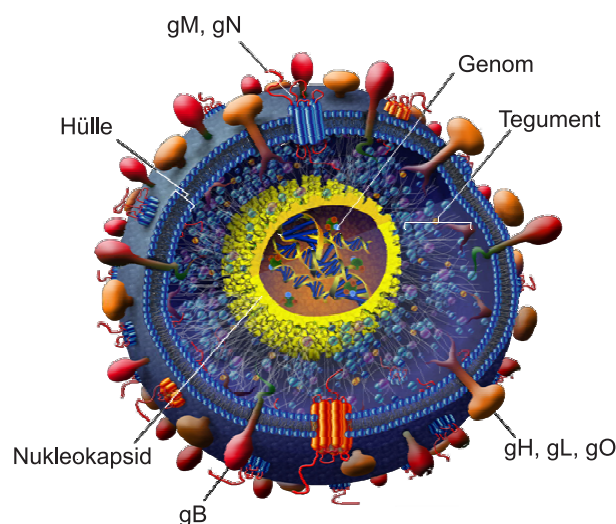


Abb. 1.1: Virionstruktur von hCMV. Modell der Struktur eines hCMV Partikels (verändert nach Strelow *et al.*, 2006). Glykoprotein-Komplex I: gB; Glykoprotein-Komplex II: gM, gN; Glykoprotein-Komplex III: gH, gL, gO.

Neben infektiösen Virionen mit einem vollständigen Genom in ihrem Nukleokapsid bildet das hCMV *in vitro* auch nicht infektiöse umhüllte Partikel (*non infectious enveloped particles*, NIEPs) und sogenannte *dense bodies* (DBs), ebenfalls nicht infektiöse umhüllte Partikel, die vorwiegend aus dem Tegumentprotein pp65 bestehen (Sarov und Abady, 1975; Irmiere und Gibson, 1983). Beide Partikeltypen besitzen eine dem Virion entsprechende Hüllmembran mit den integrierten viralen Proteinen, aber kein virales Genom. mCMV infizierte Zellen bilden im Gegensatz zum hCMV keine DBs, können aber infektiöse Multikapsidvirionen mit einem Durchmesser von bis zu 600nm formen. Sie sind in ein Tegument eingebettet und von einer Lipidmembran umhüllt (Chong und Mims, 1981; Weiland *et al.*, 1986).

1.2.2 Genomstruktur

Cytomegaloviren besitzen ein lineares, doppelsträngiges (ds) DNA-Genom mit terminalen repetitiven Elementen, deren Länge bei unterschiedlichen CMVs variiert. Im Gegensatz zum Genom des mCMV enthält das hCMV-Genom zusätzliche interne repetitive Elemente (zur Übersicht: Mocarski *et al.*, 2006). Die Vertreter der *β-Herpesvirinae* besitzen mit einer Länge von über 230kbp die größten herpesviralen Genome. Das mCMV-Genom kodiert für ungefähr 170 offene Leserahmen (*open reading frame*, ORF) (Rawlinson *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 2006), während im Genom des hCMV 165 ORFs (Dolan, 2004) bis 200 ORFs (Novotny *et al.*, 2001) identifiziert wurden. Den meisten dieser ORFs und ihrer putativen Genprodukte kann gegenwärtig noch keine Funktion zugeordnet werden. Beim hCMV sind nur 45 dieser Gene als essentiell für die *in vitro*-Replikation beschrieben (Dunn *et al.*, 2003).

Die Genome der Cytomegaloviren sind kolinear, d.h. die ORFs können sowohl Sequenz-homolog als auch Positions-homolog sein (Landolfo *et al.*, 2003). Die Homologien zwischen mCMV und hCMV erstrecken sich auf 78 homologe ORFs, die vorrangig im zentralen Bereich beider Genome lokalisiert sind. Trotz dieser Gemeinsamkeiten besitzen hCMV und mCMV eine unterschiedliche Genomorganisation.

1.2.3 Penetration der Wirtszelle

Die produktive Infektion einer Zelle mit hCMV beginnt mit der Adsorption des Virus an die Zelloberfläche und anschließender Fusion der Virushülle mit der Plasmamembran (Compton *et al.*, 1993). Es erfolgt zunächst die initiale Anheftung (*attachment*) des Virus an den primären Rezeptor Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG), der sich auf der Zellmembran der Wirtszelle befindet (Compton *et al.*, 1993; Boyle und Compton, 1998). Für die Bindung der Virionen an die Zelloberfläche sind vermutlich die viralen Glykoproteine gM, gN und gB der Virushülle verantwortlich, gefolgt von einer stabilen Bindung des gB-Proteins an den Epidermis-Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) (Wang *et al.*, 2003). Allerdings ist der Nachweis der gB-EGFR-Bindung aktuelleren Untersuchungen zufolge umstritten (Isaacson *et al.*, 2007). Weitere Rezeptoren bzw. Proteine der Zelloberfläche, an welche hCMV-Virionen binden können, sind Annexin II (Wright *et al.*, 1994; Wright *et al.*, 1995), CD13 (Giugni *et al.*, 1996) oder auch Integrine. Für Integrin-Heterodimere ist eine Bindung mit dem Glykoprotein gB beschrieben worden (Feire *et al.*, 2004). Nach der Bindung kann die Lipidhülle des Virions pH-unabhängig mit der Zellmembran verschmelzen (*fusion*) und das vom Tegument umgebene Nukleokapsid wird in das Cytoplasma der Zielzelle entlassen (Penetration) (Compton *et al.*, 1992; zur Übersicht: Boehme und Compton, 2006). Zudem werden alternative Eintrittsrouten für hCMV in die Wirtszelle diskutiert. Endocytose wurde in einigen Herpesviren, wie z.B. EBV, HSV und HHV8 beobachtet (Miller und Hutt-Fletcher, 1992).

Für hCMV zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen Endocytose in verschiedenen Zelltypen, unter anderem in Endothelzellen (Bodaghi *et al.*, 1999; Sinzger, 2008). Im Cytoplasma wird das Kapsid nach Entfernung des Teguments (*uncoating*) über Mikrotubuli zum Zellkern transportiert (Ogawa-Goto *et al.*, 2003). Nach Bindung des Nukleokapsids an den Kernporenkomplex wird die virale DNA in das Nukleoplasma abgegeben und zirkularisiert dort zu einem Histon-assoziierten Episom (Marks und Spector, 1984; Bolovan-Fritts *et al.*, 1999). Im Kern erfolgt die Genexpression und Replikation des CMV-Genoms.

1.3 Die akute CMV-Infektion

Während der akuten (produktiven) Infektion disseminieren Cytomegaloviren im Wirt und infizieren permissive Zellen und Gewebe. Das folgende Kapitel gibt eine Übersicht über die virale Genexpression während der akuten Infektion, den Organotropismus der Cytomegaloviren und die Kontrolle der akuten Infektion durch das Immunsystem.

1.3.1 Genexpression und CMV-Replikation

Die Genexpression von CMV ist, wie bei allen Herpesviren, kaskadenartig reguliert. Dabei werden drei aufeinander folgende Phasen unterschieden: die *immediate early*- (IE), *early*- (E) und *late*- (L) Phase (zur Übersicht: Mocarski und Courcelle, 2001). Die IE-Genexpression beginnt unmittelbar nach Eintritt in den Zellkern und erreicht, unabhängig von der *de novo*-Synthese viraler Proteine, 4h bis 8h nach der Infektion ihren Höhepunkt. Bei hCMV befinden sich zwei der transkribierten IE-Gene (Chee *et al.*, 1990; zur Übersicht: Stinski *et al.*, 1991; zur Übersicht: Landolfo *et al.*, 2003) und bei mCMV drei der transkribierten IE-Gene (Keil *et al.*, 1987) im *Major Immediate Early*- (MIE) Lokus und werden als MIE-Gene bezeichnet (s. Abb. 1.2). In diesem Lokus befindet sich der *Major Immediate Early Promoter Enhancer-Enhancer Promoter* (MIE-PEEP; Kropp *et al.*, 2009), eine regulatorische DNA-Sequenz der MIE-Gene. In jüngeren Arbeiten von Stinski und Isomura (2008) wurde beschrieben, das hCMV eine ähnliche Anordnung der MIE-Gene aufweist wie mCMV. Es gibt eine Region, die die Transkription des UL127-Gens (vergleiche *ie2*-Gen bei mCMV) auf der rechten Seite des MIE-PEEP dauerhaft unterdrückt. Fehlt diese Repressor-Region, kommt es zur Expression dieses Gens (Angulo *et al.*, 2000; Lashmit *et al.*, 2002; Lundquist *et al.*, 1999).

Die DNA-Replikation erfolgt vom episomal vorliegenden Genom nach dem Prinzip des *rolling circle*. Dabei ist die neusynthetisierte DNA kovalent mit dem Ausgangsmaterial verbunden. Die neusynthetisierten viralen Genome liegen demnach als Konkatemere vor, die vor der Verpackung in die Nukleokapside in einzelne lineare Genome gespalten werden (Marks und Spector, 1988). Die Nukleokapside werden durch die innere und äußere Kernmembran transportiert. Dabei gelangen sie in einem als *primary envelopment* bezeichneten Vorgang durch die innere Kernmembran in den perinukleären Raum, wobei sie von der inneren Kernmembran umhüllt werden. Diese temporäre Lipidhülle fusioniert anschließend mit der äußeren Kernmembran (*de-envelopment*) und entlässt die Nukleokapside in das Cytosol. Durch einen weiteren Schritt, das *secondary envelopment*, werden die nackten Nukleokapside im trans-Golgi-Netzwerk mit einer doppelten Hüllmembran versehen. Die äußere dieser Hüllmembranen fusioniert schließlich mit der Plasmamembran der Zelle und setzt Virionen mit einer einfachen Hülle frei (zur Übersicht: Eickmann *et al.*, 2006). Eine schematische Darstellung der Virionmorphogenese bei hCMV ist in Abb. 1.3 gezeigt.

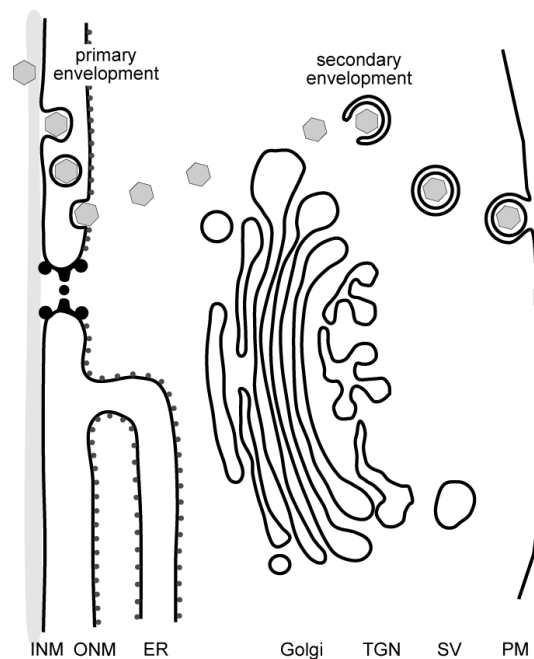


Abb. 1.3: Primary und secondary envelopment während der Virionmorphogenese. INM, innere Kernmembran; ONM, äußere Kernmembran; ER, Endoplasmatisches Retikulum; TGN, trans-Golgi-Netzwerk; SV, sekretorische Vesikel; PM, Plasmamembran (verändert nach Eickmann *et al.*, 2006).

1.3.2 Organtropismus der akuten CMV-Infektion

Als Folge eines direkten Kontakts mit infektiösem Sekret eines infizierten Individuums beginnt eine Primärinfektion mit CMV meistens in mucosalen Epithelien. Nach der Infektion folgt eine systemische Phase der Virämie, in der infektiöses Virus via Leukocyten disseminiert und jedes

Organ bzw. Gewebe (Lunge, Pankreas, Niere, Leber, Milz, Speicheldrüsen, Plazenta, Knochenmark und Herz) infizieren kann (Sinzger und Jahn, 1996; Bissinger *et al.*, 2002). Obwohl virale DNA im Plasma nachgewiesen werden kann (Spector *et al.*, 1999), liegt das infektiöse Virus im Blut nicht zellfrei vor. Im hämatopoetischen System sind verschiedene Zellpopulationen wie z.B. Monocyten oder Makrophagen (Mocarski und Courcelle, 2001) und dendritische Zellen (DC) (Andrews *et al.*, 2001; Raftery *et al.*, 2001; Dalod *et al.*, 2003) permissiv für eine produktive CMV-Infektion.

Die Lunge stellt ein Hauptzielorgan der hCMV und der mCMV Infektion dar (Baltesen *et al.*, 1993), in welcher hCMV in Epithelzellen, mesenchymalen Zellen, Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Granulocysten und Monocyten/Makrophagen nachgewiesen werden kann (Bissinger *et al.*, 2002). Die Leber mit ihren verschiedenen Zelltypen wie Gallengangszellen, Endothelzellen, Kupffer-Zellen und Hepatocyten ist ebenfalls ein Zielorgan für CMV (Podlech *et al.*, 1998; Bissinger *et al.*, 2002).

Ein weiteres wichtiges Ziel einer hCMV-Infektion sind vaskuläre Endothelien, die eine wesentliche Rolle in der viralen Replikation und Dissemination spielen. Infizierte Endothelzellen können in Kapillaren und Venolen verschiedener Organe wie der Lunge oder dem Gastrointestinaltrakt nachgewiesen werden (Sinzger *et al.*, 1995). Die infizierten Endothelzellen können sich von der Gefäßwand ablösen und in den Blutstrom gelangen, wo sie als *circulating cytomegalic infected cells* (CCIC) detektiert werden können (Grefte *et al.*, 1993b; Percivalle *et al.*, 1993). So können sie die CMV-Infektion durch Ausscheidung von Viren in den Blutkreislauf (Myerson *et al.*, 1984), Kontakt zu angrenzenden Zellen bzw. transient adherenten Leukocyten übertragen (Adler und Sinzger, 2009). Bentz und Kollegen (2006) postulieren, dass infizierte Endothelzellen naive Monocyten rekrutieren und diese aktivieren, um durch endotheliale Zellverbindungen in das umgebende Gewebe zu gelangen und das Virus zu verbreiten. Die hCMV-Infektion fördert dabei die Bindung naiver Monocyten an, und die Wanderung durch das Endothelium, indem die infizierten Endothelzellen verstärkt Adhäsionsmoleküle exprimieren, eine größere Permeabilität aufweisen und den Transfer des Virus zu den eindringenden Monocyten ermöglichen (Bentz *et al.*, 2006).

1.3.3 Kontrolle der CMV-Infektion durch das Immunsystem

Bei einem immunkompetenten Wirt verläuft eine Primärinfektion mit CMV meist inapparent, da die Infektion effektiv durch das Immunsystem kontrolliert wird. Diese Kontrolle wird durch das Zusammenspiel verschiedener Komponenten der angeborenen (*innate immunity*) und der erworbenen Immunität (*adaptive immunity*) gewährleistet (zur Übersicht: Krmpotic *et al.*, 2003).

Zu frühen Zeitpunkten der Infektion spielt die angeborene Immunität eine wichtige Rolle in der Immunabwehr des CMV. Zu den Komponenten des angeborenen Immunsystems gehören u.a. Makrophagen, DC und v.a. natürliche Killerzellen (NK-Zellen) (Bukowski *et al.*, 1984; Welsh *et al.*, 1991; Arase *et al.*, 2002; zur Übersicht: Jonjic *et al.*, 2006). Die angeborene Immunität gegen CMV und andere virale Infektionen ist allerdings nur temporär und vermittelt im Gegensatz zum erworbenen Immunsystem keinen dauerhaften Schutz.

Bedingt durch klonale Expansion und Differenzierung der Lymphocyten setzt die Immunantwort durch T-Zellen zeitverzögert, etwa 3 bis 5 Tage nach der Infektion, ein und erreicht nach ungefähr 7 bis 10 Tagen ihr Maximum (Quinnan *et al.*, 1978; Hokeness *et al.*, 2007). Für die Terminierung der Infektion ist in erster Linie die Immunantwort durch Virus-spezifische cytotoxische CD8 T-Zellen (CTL) notwendig (Welsh *et al.*, 1991). Diese erkennen ein fremdes Antigen, das von einer antigenpräsentierenden Zelle als prozessiertes Peptid, gebunden an ein MHC Klasse I-Molekül, präsentiert wird. Die spezifische Erkennung der Peptid-MHC-Komplexe auf der Oberfläche infizierter Zellen erfolgt über den T-Zell Rezeptor (TCR) auf der Oberfläche der CTLs (Marrack und Kappler, 1987). Nach dem Antigenkontakt differenzieren naive CD8 T-Zellen zu CTLs, erkennen infizierte Zellen und lysieren diese. Nach beendeter Immunantwort überdauert ein Teil der Virus-spezifischen T-Zellen als Gedächtniszellen im Organismus, damit bei erneuter Infektion oder Virusrekurrenz und dem damit vermittelten Antigenkontakt eine schnelle Immunantwort sichergestellt wird. Die vorrangige Bedeutung der adaptiven Immunantwort durch CTLs für die Kontrolle der CMV-Infektion konnte mehrfach bestätigt werden (Quinnan *et al.*, 1978; Reddehase *et al.*, 1985; Reddehase *et al.*, 1987; Podlech *et al.*, 1998; Podlech *et al.*, 2000).

1.4 Die latente CMV-Infektion

Nach der von Roizman und Sears (1987) aufgestellten Definition von Latenz versteht man darunter das Überdauern funktioneller viraler Genome in einem nicht replikativen Zustand im Wirt nach Kontrolle der produktiven Primärinfektion. Aus diesem Zustand heraus können die latenten Virusgenome durch Stimuli jederzeit reaktivieren, was zur Rekurrenz infektiöser Viren führt (Roizman und Sears, 1987). Lange umstritten war die Frage, ob die Virusreplikation von CMV während der Latenz eingestellt ist (molekulare Latenz) oder ob die Virusproduktion in latent infizierten Individuen unterhalb der Nachweisgrenze persistiert. Für mCMV konnte eine molekulare Latenz sowohl in Milz und Niere (Pollock und Virgin, 1995), als auch in der Lunge (Kurz *et al.*, 1997) bestätigt werden. Die zuvor aufgestellte Hypothese, nach der die Detektion von *IE1*-Transkripten in latent infizierten Mäusen als Beweis für eine persistierende Infektion angesehen wurde (Henry und Hamilton, 1993; Yuhasz *et al.*, 1994), konnte demnach nicht bestätigt werden und erwies sich als falsch.

1.4.1 Virale Genexpression während der Latenz

Molekulare Latenz von CMV bedeutet nicht die vollständige Abwesenheit viraler Transkripte. In experimentellen Infektionen von Granulozyten-Makrophagen- (GM) Progenitorzellen konnten bei ausbleibender Virusproduktion verschiedene hCMV-Transkripte identifiziert werden (Kondo *et al.*, 1994; Kondo und Mocarski, 1995). Somit konnten für hCMV in GM-Progenitoren sowohl Latenz-assoziierte *sense*- als auch *antisense*-Transkripte aus der *ie1/ie2*-MIE-Region nachgewiesen werden (Kondo *et al.*, 1996). Es zeigte sich, dass selbst nach Infektion von GM-Progenitoren in Zellkultur nur wenige Latenz-assoziierte Transkripte in einem sehr geringen Anteil der GM-Progenitoren exprimiert werden (Slobedman und Mocarski, 1999). Die Latenz-assoziierten *sense*-Transkripte unterscheiden sich von den *IE1/IE2*-Transkripten der produktiven Phase durch Nutzung alternativer *transcription start sites*. Eines der vier *sense*-Transkripte (ORF94) wurde näher analysiert und kodiert für ein Kernlokalisierungssignal, ist aber sowohl für die produktive, als auch für die latente Infektion nicht essentiell (White *et al.*, 2000). Ein Problem der hCMV Latenz-Forschung ist das Fehlen eines *in vivo*-Modells zur experimentellen Untersuchung der Latenz in Organen.

Für mCMV konnten in der Lunge und der Milz während der Latenz ebenfalls Transkripte des MIE-Lokus detektiert werden. Es handelt sich hierbei um gespleißte *IE1*- und *IE2*-Transkripte der *ie1/ie3*- und der *ie2*-Transkriptionseinheit in der Lunge (Kurz *et al.*, 1999; Kurz und Reddehase, 1999; Grzimek *et al.*, 2001) und um *IE1*-Transkripte in der Milz (Henry und Hamilton, 1993), deren Gene spontan „*desilenced*“ vorliegen. Der MIE-*Enhancer* wird zwar nicht absolut gesehen zur *in vitro*- und *in vivo*-Replikation benötigt, jedoch erhöht dieser die Wahrscheinlichkeit einer Infektion und wird benötigt, um ein exponentielles Wachstum der Viren zu gewährleisten. Durch differentielles *Splicing*, gefolgt von Translation, entstehen aus der *ie1/3*-Transkriptionseinheit die Proteine IE3 (Exons 2, 3, 5) und IE1 (Exons 2, 3, 4). Das gebildete IE1-Protein ist *in vitro* nicht essentiell, es ist allerdings wesentlich für eine effiziente *in vivo*-Replikation in infizierten Zellen und damit für die *in vivo*-Virulenz (Ghazal *et al.*, 2005). Das IE1-Protein enthält das im Haplotyp H-2^d immundominante IE1-Peptid. *IE3*-Transkripte, die durch differentielles *Splicing* des primären *IE1/IE3*-Transkripts entstehen, dienen als Transaktivatoren für die nachgeschaltete virale E-Genexpression und sind damit essentiell für den produktiven Zyklus (Angulo *et al.*, 2000). Der Zustand der Latenz bleibt weiterhin bestehen, weil das differentielle *Splicing* zum Transaktivator-Transkript *IE3* nicht erfolgt. Entsprechend konnten während der Latenz keine *IE3*-Transkripte nachgewiesen werden, wodurch andere essentielle Gene der E- oder der L-Phase, wie beispielsweise M55 (*gB*), nicht transkribiert werden (Simon *et al.*, 2006a; zur Übersicht: Simon *et al.*, 2006b; Reddehase *et al.*, 2008). Das IE2-Protein ist für die Etablierung von Latenz nicht notwendig (Cardin *et al.*, 1995).

1.4.2 Latenzort von CMV

Die zellulären Orte der CMV-Latenz konnten bisher nicht für alle Organe eindeutig identifiziert werden. Für hCMV wurden virales Genom und Latenz-assoziierte virale Transkripte in einer geringen Anzahl hämatopoetischer Zellen der myelomonocytären Differenzierungsreihe gefunden (Kondo *et al.*, 1994; Hahn *et al.*, 1998; zur Übersicht: Streblow und Nelson, 2003; Mocarski *et al.*, 2006). Das latente virale Genom könnte sich demnach durch klonale Expansion von GM-Progenitoren im Knochenmark vermehren und über die Ausschleusung von Monocyten disseminieren. Für mCMV gelang der Nachweis des viralen Genoms ebenfalls in myelomonocytären Zellen (Pollock *et al.*, 1997). Auch Makrophagen und DC kommen als zelluläre Orte der Virusreaktivierung in Betracht, da sie permissiv für eine produktive CMV-Infektion sind. Longitudinale Analysen für mCMV zeigten eine kontinuierliche Abnahme der Menge an viraler DNA in Knochenmark und Blut, wohingegen in unterschiedlichen Organen eine hohe Genomlast lebenslang nachweisbar blieb (Kurz *et al.*, 1997; Kurz und Reddehase, 1999; zur Übersicht: Reddehase *et al.*, 2002). In Übereinstimmung damit zeigten Seckert *et al.* (2008), dass latente virale DNA in einer geringen Menge in Knochenmarkszellen (KMZ) zu finden ist (ungefähr 5 latente Genome pro 1×10^6 KMZ) im Vergleich zur Lunge mit 7500 latenten viralen Genomen pro 1×10^6 Lungenzellen. Experimente von Seckert *et al.* (2008) haben gezeigt, dass latentes mCMV nicht durch KMZ auf einen naiven immunkomprimierten Rezipienten übertragen werden kann. Für hCMV fehlen zur Zeit noch solche Untersuchungen. Es scheint, als wäre die Latenz im Knochenmark nur temporär, während der Ort der permanenten Latenz ein in verschiedenen Organen (Lunge, Milz, Speicheldrüse, Niere, Nebenniere und Herz) vorhandener Zelltyp sein muss (Reddehase *et al.*, 1994). Mögliche Kandidaten hierfür wären endotheliale Zellen (Mercer *et al.*, 1988; Koffron *et al.*, 1998) und/oder langlebige, gewebsständige Makrophagen/Histiocyten (Koffron *et al.*, 1998). Gemessen an ihrer Genomlast (ungefähr 2.000 bis 5.000 latente Genome pro 1×10^6 Lungenzellen) ist die Lunge ein Hauptort der mCMV-Latenz (Baltesen *et al.*, 1993; Kurz *et al.*, 1997; Kurz und Reddehase, 1999; Grzimek *et al.*, 2001; Simon *et al.*, 2005).

Da aber auch durch Lebertransplantationen häufig latentes CMV übertragen wird, zählt die Leber ebenfalls zu einem medizinisch relevanten Organ der CMV-Latenz. Arbeiten von Seckert *et al.* (2009) konnten für die Leber einen Zelltyp identifizieren, der die latente virale DNA enthält. Die Quantifizierung viraler Gene in verschiedenen Zelltypen der Leber gab den Hinweis darauf, dass Endothelzellen ein zellulärer Ort der mCMV-Latenz sind. Es konnte eine Anreicherung viraler Genome in der NPLC-Fraktion (*non parenchymal liver cell*) aus der Leber latent infizierter Mäuse beobachtet werden. Die NPLC-Fraktion wurde mittels verschiedener Zelloberflächenmarker weiter aufgetrennt. Latente virale DNA konnte in zwei Zellpopulationen lokalisiert werden, den CD31⁺ NPLC und den CD146⁺ NPLC, beides Marker für Endothelzellen. In den beiden LSEC-angereicherten Fraktion (*liver sinusoidal endothelial cells*) waren virale Genome detektier-

bar, im Gegensatz zu den restlichen Zellen der NPLC, wie Kupffer-Zellen und Leber-spezifischen NK-Zellen. Nach dem Transfer der LSEC latent infizierter Mäuse konnte eine Reaktivierung des Virus aus Lungenexplantatkulturen beobachtet werden. Dieses Ergebnis identifizierte LSEC als latent infizierter Zelltyp in der Leber.

1.4.3 Kontrolle der CMV-Latenz durch CD8 T-Zellen

Wie in Versuchen mit B-Zell-defizienten Mäusen (μ^-/μ^- ; C57BL/6) gezeigt werden konnte, wird die Kontrolle der Virusreaktivierung während der latenten mCMV-Infektion nicht durch die humorale Immunantwort vermittelt. Die *in vivo*-Depletion von CD8 T-Zellen in diesen latent infizierten Mäusen führt dagegen zur Virusrekurrenz. Die Inzidenz der Rekurrenz konnte jedoch durch zusätzliche Depletion von CD4 T-Zellen sowie NK-Zellen noch erhöht werden (Polic *et al.*, 1998). Die an der Kontrolle der rekurrenten Infektion beteiligten CD8 T-Zellen erkennen spezifisch antigene Peptide, die während der viralen Genexpression auf der Zelloberfläche durch MHC Klasse I-Moleküle präsentiert werden.

Bedingt durch die Latenz-assoziierte Genexpression von *ie1* konnte eine Akkumulation IE1-Epitop-spezifischer CD8 T-Zellen in latent infizierten Tieren nachgewiesen werden. Die Prozessierung der entstandenen IE1-Proteine führt zur Präsentation L^d-restringierter IE1-Peptide (168-YPHFMPTNL-176), die Epitop-spezifische CD8 T-Zellen restimulieren können. Sind diese CD8 *effector-memory* T-Zellen (CD8-T_{EM}) aktiviert, haben sie einen CD62L^{low} Phänotyp und können vornehmlich in der Lunge nachgewiesen werden (Holtappels *et al.*, 1998; Holtappels *et al.*, 2000; Podlech *et al.*, 2000; zur Übersicht: Holtappels *et al.*, 2006). Durch Versuche mit einer Virusmutante, bei der die Präsentation des antigenen L^d-restringierten IE1-Peptids durch eine Punktmutation in der MHC Klasse I-Ankeraminosäure verhindert wurde, konnten eine Erhöhung der *IE1*-Transkripte und ein sporadisches *Splicing* zu *IE3*-Transkripten in latent infizierten Lungenzellen beobachtet werden (Simon *et al.*, 2006a). Die Anzahl viraler Genome in der Lunge der mit dieser Mutante latent infizierten Mäuse nahm jedoch trotz der Detektion von *IE1*-, *IE3*- und einer sehr geringen Zahl von *M55*- (*gB*) Transkripten nicht zu. Die fehlende Immunkontrolle der IE1-spezifischen CD8 T_{EM}-Zellen (Simon *et al.*, 2006a) muss demnach von anderen CD8 T-Zellen, z.B. von CD8 T_{EM}-Zellen, die spezifisch für ein weiteres immundominantes Peptid aus dem *m164*-Gen sind, kompensiert werden (Holtappels *et al.*, 2002).

1.4.4 Reaktivierung

Die latente Infektion ist definiert als die Abwesenheit infektiöser Viruspartikel bei gleichzeitiger Präsenz viraler Genome. Die Frequenz der Reaktivierung von latentem CMV erhöht sich mit Abnahme der zellulären Immunität.

Sowohl durch Immunsuppression, als auch durch andere Effekte wie zelluläre Differenzierung, die Freisetzung proinflammatorischer Cytokine oder allogene Stimulation kann eine Virusreaktivierung stattfinden (zur Übersicht: Hummel und Abecassis, 2002). Ein Mechanismus zur Regulation der IE-Genexpression von hCMV und folglich der Reaktivierung aus der Latenz ist die Chromatinveränderung (*chromatin remodeling*) (zur Übersicht: Bain *et al.*, 2006; Reeves und Sinclair, 2008; 2010). Das hCMV-Genom liegt während der Latenz als Episom vor, das, mit zellulären Histonen assoziiert, eine Chromatinstruktur höherer Ordnung aufweist. *In vitro*-Versuche ergaben, dass nicht permissive Zellen durch die Behandlung mit dem Histondeacetylase (HDAC) Inhibitor Trichostatin A (TSA) permissiv für die virale IE-Genexpression wurden (Meier, 2001; Murphy *et al.*, 2002). Des Weiteren konnte durch die Überexpression von HDAC in permissiven Zellen die virale IE-Genexpression inhibiert werden (Murphy *et al.*, 2002). Arbeiten von Liu *et al.* (2008) konnten auch für mCMV *in vivo* bestätigen, dass die Histonmodifikation eine wesentliche Rolle bei der Genexpression während der Latenz spielt. Die Verbindung des Genoms mit den Histonen ist während der Latenz viel stärker als während der akuten Infektion. Während der akuten Phase der Infektion ist das virale Genom mit Histonacetylasen verbunden, die Lysin 9 und Lysin 14 der H3 Histonuntereinheit acetylieren und die Chromatinstruktur für die Transkription öffnen. Das virale Genom ist während der Latenz dagegen mit HDAC assoziiert und die Histonuntereinheiten H3 und H4 liegen weniger acetyliert vor. Eine weitere posttranslationale Modifikationsmöglichkeit der Histone ist die Methylierung der Aminosäure- (AS) Reste. Eine Methylierung der Histone kann sowohl mit einem positiven, als auch mit einem negativen Effekt auf die Transkription korrelieren. In transkriptionell aktiven Zellen ist Lysin 4 des H3 methyliert. Eine Methylierung der Lysinreste 9 und 27 des H3 ist dagegen mit transkriptioneller Hemmung assoziiert (Berstein *et al.*, 2002; zur Übersicht: Kouzarides, 2007; Santos-Rosa *et al.*, 2002). Dies ergibt eine direkte Korrelation zwischen den unterschiedlichen Chromatinkonformationen und der transkriptionellen Aktivität des MIE-PEEP. Während es bei hCMV lediglich möglich ist, die Reaktivierung durch Chromatinveränderungen *in vitro* zu untersuchen, können durch das Maus-Modell Latenz und Reaktivierung *in vivo* im Gewebeverband unter Kontrolle des Immunsystems beobachtet werden. Transkriptanalysen von Lungen latent infizierter Tiere, die in eine definierte Anzahl an Lungenstücken geteilt wurden, ergaben eine vielfältige Expression von IE-Transkripten (Grzimek *et al.*, 2001). Durch weitere Transkriptanalysen ausgewählter Markergene aus der E- und L-Phase wurde die sogenannte *silencing/desilencing* Hypothese aufgestellt. Demnach reicht eine offene Chromatinstruktur am MIE-Lokus alleine nicht aus, um eine Reaktivierung zu induzieren.

Vielmehr müssen alle essentiellen Gene des mCMV-Genoms zumindest temporär *desilenced* vorliegen (zur Übersicht: Reddehase *et al.*, 2008). Versuche von Kurz und Reddehase (1999) haben gezeigt, dass es mehrere *checkpoints* gibt, durch die das Immunsystem präsentierte antigene Peptide erkennt und die Reaktivierungsereignisse durch CD8 T-Zellen terminiert. Damit konnte bewiesen werden, dass CMV-Latenz und Reaktivierung nicht auf den MIE-Lokus reduziert werden können.

Bislang existieren drei verschiedene Modelle, mit denen die CMV-Latenz untersucht wird (zur Übersicht: Hummel und Abecassis, 2002; Reddehase *et al.*, 2002). Das erste Modell beschreibt die Immunsuppression als Auslöser der Reaktivierung (Polic *et al.*, 1998). Diese kann durch eine Ganzkörperbestrahlung (Kurz und Reddehase, 1999), cytotoxische Substanzen wie Cyclophosphamid (Mayo *et al.*, 1977; 1978) oder Depletion lymphoider Zellen mittels Antikörper (Ak) erfolgen (Bevan *et al.*, 1996; Polic *et al.*, 1998). Ein weiteres Modell nimmt an, dass die Reaktivierung durch zelluläre Differenzierung erfolgt. Allerdings ist die Beobachtung, dass Reaktivierung durch zelluläre Differenzierung induziert wird, für die hCMV-Infektion nicht allgemein gültig. hCMV etabliert Latenz in hematopoetischen Vorläuferzellen und Monocyten (Hahn *et al.*, 1998; Mendelson *et al.*, 1996). Diese sind jedoch nicht permissiv für eine Infektion *in vitro*, können aber durch Cytokin-verursachte Differenzierung zu Makrophagen permissiv werden (Soderberg-Naucler *et al.*, 1997) und es können *IE*-Transkripte nachgewiesen werden. In seropositiven Patienten konnte die *IE1*-Expression durch Differenzierung der latent infizierten Monocyten mit dem *GM-colony stimulating factor* (GM-CSF) zu Makrophagen induziert werden (Taylor-Wiedeman *et al.*, 1994). Eine Differenzierung alleine ist jedoch nicht ausreichend, um eine Virusreaktivierung zu verursachen (Meier, 2001). In einem dritten Modell wird die Reaktivierung durch allogene Transplantation von Organen wie Niere und Lunge (Bruning *et al.*, 1986; Yagyu *et al.*, 1994; Hummel *et al.*, 2001) bzw. durch TNF oder IFN γ (Hahn *et al.*, 1998; Soderberg-Naucler *et al.*, 1997), die durch allogene Stimulation induziert werden, hervorgerufen. Dieses Modell ist allerdings nicht allgemein gültig, da eine Reaktivierung auch in syngenem Transplantations-Modellen oder nach Zelltransfer beobachtet wurde (Mayo *et al.*, 1978; Hamilton und Seaworth, 1985; Bruning *et al.*, 1986).

1.5 Klinische Relevanz der CMV-Infektion

hCMV ist in der menschlichen Population ubiquitär verbreitet, wobei die Verbreitung des Virus abhängig von Alter und sozioökonomischen Faktoren ist. Untersuchungen haben gezeigt, dass in Mitteleuropa und Nordamerika ungefähr 40% bis 60% der Bevölkerung hCMV-positiv sind (zur Übersicht: Mocarski *et al.*, 2006; Ho, 2008). In Entwicklungsländern liegt die Durchseuchungsrate im Kindesalter bereits bei annähernd 100% (Mocarski *et al.*, 2007). Die horizontale Übertragung erfolgt in den meisten Fällen durch Tröpfchen- oder Schmierinfektion. Infektiöse

Virionen werden neben Urin, Speichel, Genitalsekrete, Tränenflüssigkeit oder Muttermilch auch durch Blut übertragen (zur Übersicht: Pass, 2001; Mocarski *et al.*, 2006), wodurch es zu einer horizontalen Übertragung des Virus durch die Transfusion oder Transplantation von Blutprodukten bzw. Organen seropositiver Spender kommen kann. Eine vertikale Übertragung ist diaplazentar von der infizierten Mutter auf den ungeborenen Fötus oder Embryo, während des Geburtsvorgangs, oder aber über die Muttermilch auf das Neugeborene möglich (zur Übersicht: Fitzgerald *et al.*, 1990; Mocarski *et al.*, 2006). Die Inzidenz der kongenitalen hCMV-Infektion beträgt etwa 0,2% bis 2,3% aller Schwangerschaften. Die Wahrscheinlichkeit einer Infektion des Kindes nach einer Primärinfektion der Mutter ist jedoch deutlich höher (ca. 40%) als nach einer Reaktivierung (ca. 1%) (Hanshaw und Dudgeon, 1978; Stagno und Whitley, 1985).

1.5.1 Pathogenese der CMV-Infektion

Bei einem immunkompetenten Individuum wird die Infektion nach der Ausbreitung des Virus über den Blutkreislauf durch die Effektorfunktionen der angeborenen und adaptiven Immunabwehr effizient und innerhalb kurzer Zeit terminiert. Viele Zelltypen, vor allem epitheliale und endotheliale Zellen, sowie Fibroblasten sind permissiv für die Infektion mit hCMV (Sinzger und Jahn, 1996). Die Infektion eines immunologisch gesunden Menschen hat daher keine nennenswerte klinische Relevanz und verläuft zumeist inapparent (zur Übersicht: Mocarski *et al.*, 2006). Die Symptome, die bei einer hCMV-Infektion auftreten können, sind allgemeines Unwohlsein und leichtes Fieber. In den seltensten Fällen geht die Infektion mit einer Mononukleose-ähnlichen Symptomatik einher (Klemola *et al.*, 1970).

Trotz der effizienten immunologischen Kontrolle der Infektion kommt es nach Beendigung der produktiven Infektion zur Etablierung einer lebenslangen Latenz. Dies führt zu Komplikationen bei Patienten mit Therapie-bedingter oder krankhafter Immunsuppression. Bei einem seropositiven Transplantatempfänger kann durch Reaktivierung latenter Viren bzw. einer Re-Infektion eine CMV-Erkrankung in Patienten ausgelöst werden. Auch bei Neugeborenen und Ungeborenen mit nicht ausgereiftem Immunsystem führt die hCMV-Infektion zu schweren, generalisierten Verlaufsformen mit multiplen Organmanifestationen, welche unbehandelt einen letalen Ausgang haben (zur Übersicht: Ljungman und Einsele; 1994; Reddehase, 2002). Weitere Risikogruppen stellen Empfänger solider Transplantate, allogene KMZ-Empfänger und Patienten mit angeborener (*severe combined immunodeficiency*; SCID) oder erworbener (*acquired immunodeficiency syndrome*; AIDS) Immundefizienz dar.

Nach einer Knochenmarktransplantation (KMT), die eine immunsuppressive Behandlung mit sich bringt, ist bei seropositiven Patienten die Reaktivierung von endogenem Virus bzw. bei seronegativen Patienten auch die Transplantation von latent infizierten Zellen hauptsächlich für

eine CMV-Erkrankung verantwortlich (Dowling *et al.*, 1976; Neimann *et al.*, 1977, Singh *et al.*, 1988; zur Übersicht: Britt, 2006; 2008). Generell verläuft eine durch das Transplantat induzierte Primärinfektion des Rezipienten schwerwiegender als eine Re-Infektion bei bestehender Seropositivität des Rezipienten (Peterson *et al.*, 1980; zur Übersicht: Pollard, 1988), wobei die Schwere der Erkrankung vom transplantierten Organ und vom Grad der Immunsuppression abhängig ist (Bissinger *et al.*, 2004). Interstitielle Pneumonien, Kolitis, Gastroenteritis, Hepatitis und Retinitis sind dabei die am weitesten verbreiteten Erkrankungen bei KMT-Patienten (Boeckh und Bowden, 1995; Meyers *et al.*, 1986; zur Übersicht: Mocarski *et al.*, 2006). Ein weiterer Risikofaktor für eine CMV-Erkrankung nach einer allogenen KMT ist die allogene Reaktivität, bedingt durch die Histoinkompatibilität für *Minor Histocompatibility Antibodies* von Spender und Empfänger. Zur Prophylaxe der *graft versus host disease* (GvHD) erhalten deshalb Empfänger von allogenen KMZ bei signifikanter Histoinkompatibilität von Spender und Empfänger über einen längeren Zeitraum eine immunsuppressive Therapie (Zaia und Forman, 1995). Nach autologer Transplantation, wie z.B. bei Zwillingen, kommt es trotz der Ausscheidung von CMV dagegen selten zur CMV-Erkrankung (zur Übersicht: Pass, 2001).

Bei Patienten mit SCID oder AIDS kann eine schwere CMV-Erkrankung durch eine Primärinfektion mit hCMV bzw. eine Re-Infektion oder eine Virusrekurrenz ausgelöst werden. Da etwa 90% der HIV-Patienten mit hCMV infiziert sind, stellt dieses Virus den häufigsten opportunistischen Krankheitserreger in dieser Patientengruppe dar. Eine durch die hCMV-Erkrankung bedingte Chorioretinitis wird durch die AIDS-Symptomatik der Patienten noch verstärkt (Sison *et al.*, 1991), wodurch zusätzlich das zentrale Nervensystem, sowie der Gastrointestinaltrakt betroffen sein können (René *et al.*, 1988).

1.5.2 Die mCMV-Infektion der Maus als Modellsystem für eine hCMV-Infektion

CMV sind Viren mit strikter Spezies-Spezifität, weshalb die hCMV-Infektion nicht in einem Tiermodell untersucht werden kann. Es gibt jedoch viele Erkenntnisse der mCMV-Infektion, die sich aufgrund struktureller, biologischer und genetischer Ähnlichkeiten beider Viren auf die hCMV-Infektion übertragen lassen (Rawlinson *et al.*, 1996; zur Übersicht: Reddehase, 2002, Holtappels *et al.*, 2006). Der Verlauf der CMV-Infektion und die Pathogenese z.B. sind sowohl im immunkompetenten, als auch im immunsupprimierten Wirt für beide Viren vergleichbar (zur Übersicht: Krmpotic *et al.*, 2003). Zudem weisen die virale Genexpression und der Zell-, sowie der Organotropismus von mCMV und hCMV deutliche Analogien auf, wodurch die mCMV-Infektion als Modellsystem für die Untersuchung der Infektion und der in beiden Viren nach der Terminierung der Primärinfektion etablierten lebenslangen Latenz dient (Balthesen *et al.*, 1993; Reddehase *et*

al., 1994; zur Übersicht: Reddehase *et al.*, 2002; Krmpotic *et al.*, 2003; Mocarski *et al.*, 2006). Auch die Immunkontrolle nach Infektion mit beiden Viren erfolgt mit vergleichbarer Kinetik und wird primär durch CD8 T-Zellen vermittelt (zur Übersicht: Reddehase, 2002; Holtappels *et al.*, 2006).

In dieser Arbeit wurde ausschließlich das von unserer Arbeitsgruppe etablierte Modell der syngen KMT mit anschließender Virusinfektion zur Etablierung von Latenz verwendet (Holtappels *et al.*, 2006; Mutter *et al.*, 1988). Die Empfänger werden hierbei zuerst mit einer subletalen γ -Bestrahlung immunsupprimiert. Anschließend erhalten die Tiere KMZ aus syngen Spendern und werden schließlich mit mCMV infiziert. Durch die Rekonstitution des Immunsystems des Empfängers wird eine massive Virusproduktion kontrolliert, die beim immunsupprimierten Tier zum Tode führen würde (Reddehase *et al.*, 1985). Nach ungefähr 6 bis 12 Monaten hat sich die permanente Latenz etabliert.

1.6 Struktur des Diphtherie Toxins

Diphtherie Toxin (DT) ist ein Exotoxin, das durch das lysogene *Corynebacterium diphtheriae* als ein Vorläuferprotein mit einem Signalpeptid synthetisiert und nach Abspaltung dieses Signalpeptids sezerniert wird (Collier, 2001). Die Anwesenheit des lysogenen Phagen (B-Phage) ist jedoch Voraussetzung für die Produktion des DT, da sich das Gen, das für die Produktion des Toxins kodiert (*tox*-Gen) auf der DNA des B-Phagen befindet. Durch Transduktion wird das Gen in das Bakteriengenom übertragen (Laird). Eine weitere Voraussetzung zur Produktion des Toxins ist eine geringe extrazelluläre Eisenkonzentration. Das *DtxR*-Gen, das sich auf dem Bakterienchromosom befindet, produziert ein Repressormolekül, das an den Operator des *tox*-Gens bindet. In Anwesenheit von Eisen ist dieser Repressor aktiv und verhindert so die Transkription des *tox*-Gens. Ist der Repressor inaktiv, wird das DT, bestehend aus einer einzelnen Polypeptidkette mit einer molekularen Masse von 58kDa, produziert (Collier, 2001). Das DT besteht aus zwei Fragmenten A und B, die durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind und durch Trypsin gespalten werden können (Bennett und Eisenberg, 1994). Das A-Fragment (21kDa) besteht aus der katalytischen Domäne (in Abb. 1.4 als C bezeichnet), die am aminoterminalen Ende lokalisiert ist. Das B-Fragment (37kDa) besteht aus der Transmembrandomäne (T) und der Rezeptor-Bindedomäne (R), die sich am C-terminalen Ende befinden. Die dreidimensionale Struktur des DT-Monomers ist in Abb. 1.4 dargestellt.

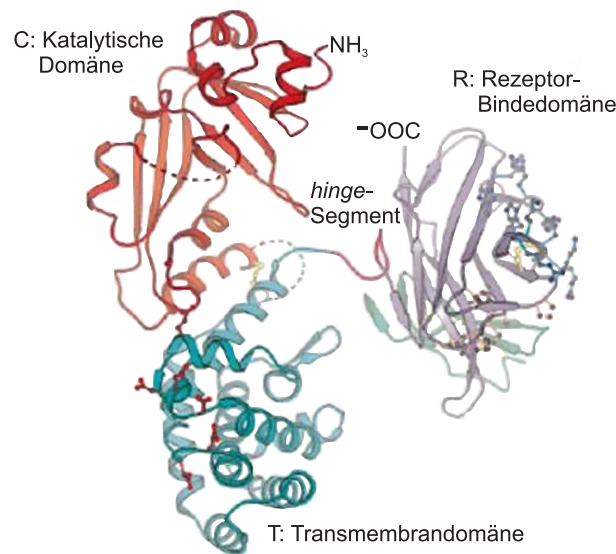


Abb. 1.4: Kristallstruktur des DT-Monomers. Die katalytische (aktive) Domäne (C) ist in rot dargestellt. Die gräuliche Domäne stellt die Rezeptor-Bindedomäne (R) dar, welche für die Anheftung an die Zelle verantwortlich ist. In grün ist die hydrophobe Transmembrandomäne (T), die für die Insertion in die endosomale Membran verantwortlich ist, dargestellt (verändert nach Louie *et al.*, 1997).

Die Aktivierung des DT erfolgt an der Zielzelle durch die proteolytische Spaltung der Fragmente A und B. Das DT ist allerdings nur für eine bestimmte Zeit funktionsfähig. Da das DT nur als Holoenzym seine toxische Wirkung entfalten kann, muss das A-Fragment an das B-Fragment gebunden sein, um an den Rezeptor zu binden. Yamaizumi *et al.* (1982) zeigten, dass die Halbwertszeit des B-Fragments in der Zelle lediglich 2h bis 5h beträgt, während das A-Fragment sehr stabil ist. Nach 16h sind nur noch Spuren von funktionsfähigem DT-B-Fragment in der Zelle vorhanden.

1.7 Der Diphtherie Toxin Rezeptor

Damit das DT seine toxische Wirkung entfalten kann, muss es von der Zelle aufgenommen werden. Dieser Vorgang erfolgt über Rezeptor-vermittelte Endocytose (s. 1.8). Als Rezeptor für das DT (Diphtherie Toxin Rezeptor, DTR) agiert eine Membran-gebundene Form des *heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor* (HB-EGF), der aufgrund seiner Verwandtschaft zu EGF und seiner Fähigkeit Heparin zu binden, so bezeichnet wurde. Dieser Rezeptor wurde erstmals in Medium von Makrophagen und Makrophagen-ähnlichen U937-Zellen als Wachstumsfaktor mit hoher Affinität für immobilisiertes Heparin identifiziert (Mitamura *et al.*, 1995).

Eine Affen-cDNA, kodierend für eine DT-sensitive Determinante des DTR, wurde 1992 aus Maus L-M-Zellen isoliert, die mit cDNA einer *Expression Library* aus Vero-Zellen transfiziert wurde (Naglich *et al.*, 1992). Maus-Zellen sind normalerweise resistent gegenüber DT. Zellen, die mit dieser DT-sensitiven Determinanten-cDNA transfiziert wurden, waren weniger resistent gegen das Toxin. Diese cDNA kodiert für ein Protein, das identisch mit dem HB-EGF-*precursor* ist. Mit der Identifizierung dieses Affen HB-EGF-Homologs wurde eine neue Funktion für den HB-EGF-*precursor*, die membrangebundene Form des HB-EGF, als Rezeptor für das DT definiert (Davis-Fleischer und Besner, 1998; Higashiyama *et al.*, 1992). Der HB-EGF-*precursor* wird gespalten und als löslicher *mature* HB-EGF entlassen. Ein signifikanter Teil des HB-EGF-*precursors* bleibt auf der Oberfläche und funktioniert als juxtacriner Wachstumsfaktor und als DTR (Naglich *et al.*, 1992; Iwamoto *et al.*, 1994).

Die Analyse der HB-EGF cDNA ergab einen ORF, der ein primäres Translationsprodukt von 208 AS prognostiziert. Es besitzt eine molekulare Masse von etwa 22kDa (Davis-Fleischer und Besner, 1998) (durch die Heterogenität des N-terminalen Endes von 19kDa bis 23kDa; Higashiyama *et al.*, 1992) und ist hoch glykosyliert. Das translatierte Protein besteht aus mehreren Domänen, die in Abb. 1.5 dargestellt sind. Am N-terminalen Ende befindet sich ein Signalpeptid, darauf folgend ein Propeptid. Die anschließende *mature* HB-EGF-Domäne beinhaltet sowohl die Heparin-Bindedomäne, als auch die DT-Bindedomäne. Am C-terminalen Ende befinden sich die Juxta-Membrandomäne, die Transmembrandomäne und die cytoplasmatische Domäne.

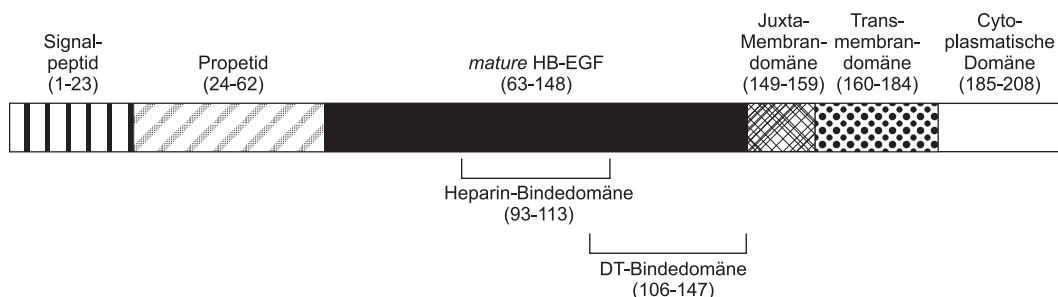


Abb. 1.5: Domänen-Struktur des HB-EGF-*precursors*. Der HB-EGF-*precursor* beinhaltet das Signalpeptid, das Propeptid, den *mature* HB-EGF (mit Heparin-Bindedomäne und DT-Bindedomäne), die Juxta-Membrandomäne, die Transmembrandomäne, sowie die cytoplasmatische Domäne. In Klammern sind die AS des ORF angegeben. (Verändert nach Higashiyama *et al.*, 1992; Goishi *et al.*, 1995)

Das DT bindet an die DT-bindende Region des *mature* HB-EGF (Raab und Klagsbrun, 1997), wobei bestimmte AS eine entscheidende Rolle bei der DT-Bindung und Toxinsensitivität spielen. Obwohl Maus-Zellen einen HB-EGF-*precursor* in gleicher Zahl wie Menschen- und Affen-Zellen exprimieren, bindet DT nicht an den Maus-HB-EGF-*precursor*, Mäuse sind demnach nicht suszeptibel für das Toxin (Eidels, 1983; Stenmark *et al.*, 1988; Iwamoto und Mekada, 2000). Aufgrund von Vergleichen zwischen dem Affen-HB-EGF-*precursor* und dem murinen

HB-EGF-*precursor*, der kein DT bindet, wurden drei *cluster* mit differierenden AS identifiziert (Hooper und Eidels, 1996). Eine Region der HB-EGF-cDNA, korrespondierend mit dem *mature* HB-EGF, wurde als wenig konserviert beschrieben. Lediglich 73% bis 76% Identität bestehen zwischen Maus-HB-EGF und dem Affen- bzw. dem Menschen-HB-EGF (Abraham *et al.*, 1993). Die Heparin-bindende Domäne im *mature* HB-EGF, sowie die Transmembrandomäne und Juxta-Membrandomäne, sind dagegen sehr hoch konserviert. Vergleicht man die gesamte Sequenz der HB-EGF-*precursor* verschiedener Spezies, bestehen 97% Sequenzhomologie zwischen dem Menschen- und Affen-HB-EGF-*precursor*, jedoch nur ungefähr 80% Sequenzhomologie zwischen Primaten und Nagern (Abraham *et al.*, 1993). Die DT-Resistenz von Zellen, die den Maus-HB-EGF exprimieren, liegt in der Substitution einiger AS begründet. Um zu untersuchen, welche AS für die DT-Bindung und Affinität verantwortlich sind, wurden zwei Versuche durchgeführt. In einem ersten Versuch wurde die DT-Sensitivität und die DT-Bindung des Affen-HB-EGF-*precursors* durch die Substitution mit den entsprechenden Maus-AS zerstört. Ein Austausch der Affen-AS Glu-141→His-141 ergab eine 4.000-fache und der Austausch der Affen-AS Ile-133→Lys-133 ergab eine vierfache Reduktion der DT-Sensitivität (Cha *et al.*, 1998). Zweifache Mutationen der Affen-AS Leu-127→Phe-127 / Glu-141→His-141, Ile-133→Lys-133 / Glu-141→His-141, sowie His-135→Leu-135 / Glu-141→His-141 ergaben jeweils eine komplette Toxinresistenz (≥ 100.000 -fach) (Cha *et al.*, 1998). In einem zweiten Versuch wurden die DT-Bindung und DT-Sensitivität des Maus-HB-EGF-*precursors* durch AS-Austausche mit der entsprechenden Affen-AS erhöht. Ein einzelner Austausch der wichtigsten Maus-AS His-141→Glu-141 ergab lediglich eine moderate Erhöhung der DT-Sensitivität um das 260-fache. Die Doppelmutation von Maus Lys-133→Ile-133 / His-141→Glu-141 führte zu einem starken Anstieg der Toxinsensitivität und Toxinaffinität um das 4.700-fache, die Triplemutation von Maus Lys-133→Ile-133 / Leu-135→His-135 / His-141→Glu-141 um das 16.000-fache (Cha *et al.*, 1998). Diese drei AS des Affen-HB-EGF-*precursor* ermöglichen es dem Maus-HB-EGF-*precursor* wie ein vollständig funktioneller DTR zu agieren.

1.8 Wirkmechanismus von Diphtherie Toxin

Durch die C-terminale Rezeptor-Bindedomäne (in Abb. 1.6 als R bezeichnet) bindet das DT an den DTR auf der Oberfläche der Wirtszelle und der DT-DTR-Komplex gelangt über Rezeptor-vermittelte Endocytose in die Zelle (Morris *et al.*, 1985; Higashiyama *et al.*, 1992; Naglich *et al.*, 1992). Der niedrige pH-Wert in den Endosomen führt zu einer Konformationsänderung des Proteins, die hydrophobe Region des B-Fragments (s. Abb. 1.6 T) wird dadurch exponiert und das DT kann in die endosomale Membran insertieren, wobei ein integrales Membranprotein entsteht. Die katalytische Domäne (s. Abb. 1.6 C), das A-Fragment, dissoziiert vom B-Fragment und wird in das Cytoplasma abgegeben. Dort wird es neu gefaltet und katalysiert den Transfer des ADP-Ribose-Anteils von NAD^+ auf einen modifizierten Histidinrest, das Diphthamid, des Elongationsfaktor-2 (EF2) (Collier, 1975).

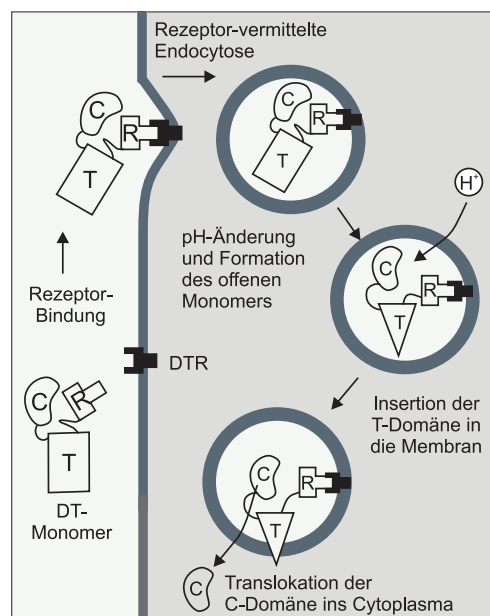


Abb. 1.6: Aufnahme und Aktivität des DT in eukaryontische Zellen. Die Rezeptor-Bindedomäne des DT-Monomers bindet an den DTR und der gesamte Komplex wird über Rezeptor-vermittelte Endocytose aufgenommen. Über mehrere Zwischenschritte kommt es zur ADP-Ribosylierung des EF2 und zur Hemmung der Translation. R, Rezeptor-Bindedomäne; T, Transmembrandomäne; C, katalytische Untereinheit; DTR, Diphtherie Toxin-Rezeptor; EF2, Elongationsfaktor-2 (nachgezeichnet von http://www.textbookofbacteriology.net/diphtheria_3.html).



Durch diese Modifikation wird der EF2 inaktiviert (Collier, 1975; Chung und Collier, 1977), was schließlich zur Inhibierung der Proteinsynthese und zum Zelltod durch Apoptose führt. Es reicht bereits ein aktives DT-Molekül aus, um eine Zelle auszulöschen (Yamaizumi *et al.*, 1978).

1.9 Das *ie2*-Gen als Integrationsort des *DTR*-Gens

Das *ie2*-Gen ist, wie bereits erwähnt, im MIE-Lokus lokalisiert. Es besitzt einen eigenen Promotor (P^2) in der MIE-PEEP-Region, der in entgegengesetzter Richtung zu *ie1/ie3* liegt (Keil *et al.*, 1987). Die *ie2*-Genregion wird gespleißt und aus Exon 3 entsteht ein Transkriptionsprodukt mit 1,75kbp Länge, erste Transkripte können bereits 1h nach der Infektion detektiert werden (Messerle *et al.*, 1991). Die maximale Expression des *ie2*-Gens tritt nach 2h auf, nach 6h bis 12h ist kaum noch *IE2*-mRNA nachweisbar. Nach ungefähr 16h bis 20h kommt es aufgrund der DNA-Replikation zu einer Re-Expression von *ie2*. Das translatierte Protein hat eine Größe von 43kDa und wird hauptsächlich zwischen 0,5h und 3h nach der Infektion produziert. Nach 4h bis 8h sind nur noch Spuren des Proteins detektierbar (Messerle *et al.*, 1991).

Wie Versuche mit einer *ie2*-defizienten Mutante gezeigt haben, hat das Fehlen des IE2-Proteins keine Auswirkungen auf das Viruswachstum in Zellkultur und spielt keine Rolle bei der transkriptionellen Regulation (Koszinowski *et al.*, 1986; Manning und Mocarski, 1988) und ebenfalls nicht für die Etablierung von Latenz. Da Mäuse der natürliche Wirt für mCMV sind, stellt sich die Frage, warum kein Phänotyp zu sehen ist. Eventuell dupliziert IE2 die Funktion eines anderen Proteins oder verstärkt die Effizienz der Virus-Wirt-Interaktion (Cardin *et al.*, 1995). Zudem ist bisher noch kein Homolog im hCMV-Genom gefunden worden (Cardin *et al.*, 1995). Es gibt jedoch Hinweise durch Computer-unterstützte Analysen, dass IE2 zwei von drei Motiven enthält, die typisch für die hCMV US22-Proteinfamilie sind (Chee *et al.*, 1990; Messerle *et al.*, 1991; Cardin *et al.*, 1995). *m142* und *m143* aus mCMV z.B., die zur US22-Genfamilie gehören, sind essentiell für die Virusreplikation, indem sie vermutlich die dsRNA-abhängige Proteinkinase R-vermittelte Beendigung der Proteinsynthese blockieren (Valchanova *et al.*, 2006). *m140* und *m141*, ebenfalls der US22-Genfamilie zugehörig, haben keinen Effekt auf die Virusreplikation in Fibroblasten, beeinträchtigen jedoch die Virusreplikation in Makrophagen *in vitro* und in der Milz der Maus (Ménard *et al.*, 2003)

Die Tatsache, dass dem *ie2*-Gen bisher noch keine Funktion zugewiesen werden konnte und es für das Viruswachstum nicht essentiell ist (Cardin *et al.*, 1995), macht dieses Gen zum idealen Integrationsort für das *DTR*-Gen. Ein weiterer und sehr essentieller Vorteil dieses Integrationsortes ist die sporadische und von *ie1* unabhängige Aktivität seines Promotors P^2 während der Latenz und die damit verbundene *ie2*- bzw. *DTR*-Genexpression, was die Untersuchung der Reaktivierungshäufigkeit während der Latenz ermöglicht.

1.10 Zielsetzung

Ein Hauptorgan der CMV-Latenz ist die Lunge. Während der latenten mCMV-Infektion tritt hier sporadisch *ie1*- und *ie2*-Genexpression auf, jedoch ist die Frequenz der Reaktivierungsereignisse bislang noch unbekannt. Die viralen *IE1*-Transkripte können durch quantitative *real-time* RT-PCR (RT-qPCR) in verschiedenen Lungenstücken detektiert werden. Es befinden sich ungefähr 10 bis 20 exprimierende Genome in 1×10^6 latenten Genomen. Da sich trotz der geringen Anzahl an *IE1*-Transkripten, gezeigt durch die Momentaufnahme (*point prevalence*) in den Lungenstücken, *IE1*-Peptid-spezifische CD8 T-Zellen während der Latenz in der Lunge anreichern, ist es wahrscheinlich, dass häufiger Reaktivierungsereignisse stattfinden, als es durch eine Momentaufnahme erfasst werden kann.

Ziel dieser Arbeit ist es, die MIE-Genexpression in ihrer Dynamik zu untersuchen (*period prevalence*). Dazu soll ein rekombinantes mCMV hergestellt werden, das das Gen für den simian DTR unter der Kontrolle des *ie2*-Promotors enthält. Zusätzlich soll zur besseren Detektion des DTR-Proteins eine Rekombinante hergestellt werden, die am C-terminalen Ende des *DTR*-Gens einen HA-tag (HA-Epitop-Sequenz (YPYDVPDYA) aus dem Hämagglutinin-Protein (HA)) enthält. Eine dritte Mutante soll hergestellt werden, die zusätzlich zum *DTR*-Gen eine Punktmutation im *IE1*-Peptid enthält. Diese Mutante soll während der Latenz die konkurrierende Immunkontrolle durch *IE1*-spezifische CD8 T-Zellen verhindern. Nach der Herstellung der rekombinanten Viren sollen diese in Zellkultur und *in vivo* charakterisiert werden, um eine Attenuierung der rekombinanten Viren auszuschließen und die Anwesenheit des DTR-Proteins zu verifizieren. Nach erfolgreicher Charakterisierung der Viren soll die Funktionalität des DTR zuerst *in vitro*, dann *in vivo* nachgewiesen werden. Dafür muss sowohl für die Zellkultur, als auch für die *in vivo*-Versuche, die richtige DT-Konzentration und die zeitliche Abfolge der DT-Behandlung etabliert werden.

Mit Hilfe dieser dann etablierten Methode zur konditionalen Depletion von rekombinanten mCMV soll schließlich die Dynamik der MIE-Genexpression untersucht werden. Dazu sollen Mäuse mit mCMV-*IE1*L176A_Δ*IE2*DTR latent infiziert werden und während der Latenz mit DT bzw. zur Kontrolle mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) behandelt werden. Da nur latent infizierte Zellen, deren *ie2*-Promotor aktiv ist, den DTR exprimieren, sollten ausschließlich diese Zellen mit DT ausgelöscht werden, was zu einer Reduktion der viralen latenten DNA-Load führen würde. Durch den Vergleich der DNA-Load der PBS-behandelten Tiere mit der DNA-Load der DT-behandelten Tiere, soll abgeschätzt werden, wie viele Genome in einem bestimmten Zeitraum ausgelöscht wurden. Somit kann erstmals ermittelt werden, in wie vielen Genomen der MIE-Lokus in einem Zeitintervall transkriptionell aktiv ist.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Allgemeine Laborgeräte und Reagenzien

2.1.1 Allgemeine Laborgeräte

Tab. 2.1: Allgemeine Laborgeräte

Gerät	Typ/Hersteller
Brutschrank Bakterien	B6 (Heraeus, Hanau)
Brutschrank Zellen	B12, B5060 (Heraeus, Hanau)
Elektroporator	Gene Pulser™ (BioRad, München)
Fluoreszenzmikroskop	Axiophot (Zeiss, Jena)
Gel-Dokumentationsanlage	Digit Store (INTAS, Göttingen) UVstar 312nm (biometra, Göttingen)
Heizplatte/Magnetrührer	IKA Combimag RET (Janke und Kunkel, Staufen)
Invertmikroskop	Leica DM (Leica, Wetzlar)
Mikrotom	HM 355 (Microm, Walldorf)
Nanodrop	(PiqLab, Erlangen)
Peristaltikpumpe	Reglo Digital (Ismatec, Wertheim-Mondfel)
Photometer	BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg)
Pipetten	(Gilson, Villies Le Bel, Frankreich) (Eppendorf, Hamburg) (Rainin, Mettler Toledo, Oakland, CA, USA)
Pipettiergerät	Pipetboy (INTEGRA Biosciences, Fernwald)
Power Supply	EPS 301, EPS 600 (Pharmacia, Erlangen)
Präparative Zentrifuge	Sorvall RC5C Plus (Thermo Scientific, Langenselbold)

Gerät	Typ/Hersteller
<i>real-time</i> Geräte	ABI Prism 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
Schüttelinkubator	Cellstar (Nunc, Wiesbaden) Certomat (Labotec, Wiesbaden) MAXQ 4000 (Thermo Fisher, Schwerte)
Schüttelwasserbad	OLS 200 (Grant, VWR, Wien)
Schwingmühle MM 300	(QIAGEN, Hilden, Retsch GmbH und Co. KG, Haan)
Sicherheitswerkbank	HERA safe HS 15/2 (Heraeus, Hanau) Template Tamer Captair bio (Erlab, Köln)
Stereo-Zoom-Mikroskop	Olympus SZX12 (Olympus, Hamburg)
Tischzentrifugen	centrifuge 5417 (Eppendorf, Hamburg) centrifuge 5417C (Eppendorf, Hamburg) centrifuge 5417R (Eppendorf, Hamburg) Labofuge 400 (Heraeus, Hanau) Megafuge 2.0 (Heraeus, Hanau) Mikrozentrifuge C-1200 (National Labnet, Woodbridge, NY, USA)
Thermocycler	GenAmp PCR System 9700 (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA)
Thermoschüttler	Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg)
Ultrazentrifuge	Sorvall Combi Plus (Thermo Scientific, Langenselbold)
Vollschutz	Typ OB 58-BA (Buchler, Braunschweig)
Kleintierbestrahlungsanlage	
Zählkammer	Neubauer-Zählkammer, Kammertiefe 0,1mm (Roth, Karlsruhe)
Zählmikroskop Zellen	Nikon SE (Nikon, Düsseldorf)

2.1.2 Plastikwaren und Verbrauchsmaterialien

Tab. 2.2: Plastikwaren und Verbrauchsmaterialien

Material	Typ/Hersteller
Autoradiographiefilm	Lumi-Film Chemiluminiscent Detection Film (Roche, Mannheim; Nr. 11666657001)
Einfrierröhrchen	1,8ml CryoTube (Nunc International, Dänemark; Nr. 375418)

Material	Typ/Hersteller
Einmal-Plastikpipetten	5ml (Sarstedt, Nümbrecht; Nr. 86.1253.001)
	10ml (Sarstedt, Nümbrecht; Nr. 86.1254.001)
	25ml (Sarstedt, Nümbrecht; Nr. 86.1685.001)
Einmal-Spritzen	1ml (Braun, Melsungen; Nr. 9161406V)
	2ml (Braun, Melsungen; Nr. 4606027V)
	50ml (Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 308500)
Einweg-Plastikschalen	100/20mm (Greiner Bio-One, Nürtingen; Nr. 664102)
Elektroporationsküvetten	1mm Spaltbreite (PeqLab, Erlangen; Nr. 71-2010-LE)
	2mm Spaltbreite (PeqLab, Erlangen; Nr. 71-2020-LE)
Filterspitzen	20µl Rainin (Mettler Toledo, Oakland; Nr. GP-L10F)
	200µl Rainin (Mettler Toledo, Oakland; Nr. GP-L200F)
	1000µl Rainin (Mettler Toledo, Oakland; Nr. GP-L1000F)
	20µl (Sarstedt, Nümbrecht; Nr. 70.760.213)
	200µl (Sarstedt, Nümbrecht; Nr. 70.760.211)
	1000µl (Sarstedt, Nümbrecht; Nr. 70.762.211)
Kanülen	0,4×12mm (Braun, Melsungen)
	0,45×12mm (Braun, Melsungen)
Mahlkugeln für MM 300 (3mm, rostfreier Stahl)	(Wälzlager Vertrieb Wiesbaden GmbH, Mainz-Kastel)
PVDF-Membran	(Millipore, Schwalbach; Nr. IPVH00010)
Reaktionsgefäße	500µl Safe Lock (Eppendorf, Hamburg; Nr. 35325)
	1,5ml (Sarstedt, Nümbrecht; Nr. 72.690)
	2ml Safe Lock (Sarstedt, Nümbrecht; Nr. 72.695)
Reaktionsgefäße (für PCR)	0,2ml MicroAmp ^R (Applied Biosystems, Foster; CA, USA: Nr. N801-0840)
	PCR Streifen 1×8 Gefäße 0,2ml (Greiner Bio-One, Nürtingen; Nr. 673210)
	Strip Caps für 8 Gefäße, Flachdeckel (Greiner Bio-One, Nürtingen; Nr. 373250)
Skalpell	(Braun, Melsungen; Nr. BA211 und BA221)
Whatman-Papier	Whatman Chromatography Paper (Whatman, Dassel; Nr. 3030690)
Zellkulturplatten	6- <i>well</i> -Flachbodenplatte, beschichtet (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 353046)
	24- <i>well</i> -Flachbodenplatte, beschichtet (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 353047)

Material	Typ/Hersteller
	48- <i>well</i> -Flachbodenplatte, beschichtet (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 353078)
	96- <i>well</i> -Flachbodenplatte, beschichtet (Greiner Bio-One, Nürtingen; Nr. 655180)
Zellkulturschalen	100/20mm, beschichtet (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 353003)
	150/25mm, beschichtet (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 353025)
Zellnylonsieb	40µm (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 352340)
	100µm (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 352360)
Zentrifugenröhrchen	15ml Spitzboden Polypropylen (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 352096)
	50ml Spitzboden Polypropylen (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 353070)
Zellschaber (steril)	25cm (Sarstedt, Nümbrecht; Nr. 83.1830)

2.1.3 Chemikalien

Tab. 2.3: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Aceton <i>p.A.</i>	(Applichem, Darmstadt; Nr. A1582,2500PE)
Acrylamid	Rotiphorese Gel30 (Roth, Karlsruhe; Nr. 3029.1)
Agarose (SeaKem LE)	(BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, ME, USA, Biozym; Nr. 840.004)
Ampicillin	(Roth, Karlsruhe; Nr. K029.1)
Ammoniumpersulfat (APS)	(Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim; Nr. A3678)
Bacto Agar	(BD Biosciences, Heidelberg; Nr. 214010)
β -Mercaptoethanol	(Roth, Karlsruhe; Nr. 4227.1)
Bromphenolblau	(Roth, Karlsruhe; Nr. A512.1)
Bovines Serum Albumin	(Serva, Heidelberg; Nr. 11920.02)
Chloramphenicol	(Roth, Karlsruhe; Nr. 3886.2)
Desoxyribonukleotidtriphosphat (dNTPs)	(Fermentas, St. Leon-Rot; Nr. R0182)
Diphtherie Toxin	(Sigma-Aldrich, Schnelldorf; Nr. D0564-1MG)
1,4-Dithiothreitol (DTT)	(Roth, Karlsruhe; Nr. 6908.1)

Chemikalie	Hersteller
DNA-Längenstandard	1kb DNA- <i>Ladder</i> (invitrogen, Karlsruhe; Nr. 15615-016)
DPBS	(GIBCO invitrogen, Karlsruhe; Nr. 14190)
Entellan	(Merck, Darmstadt; Nr. 107961)
Ethanol 100% (v/v)	(Roth, Karlsruhe; Nr. P076.1)
Ethidiumbromid (100ml)	(Roth, Karlsruhe; Nr. 2218.1)
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)	(Roth, Karlsruhe; Nr. 3619.1)
Glycerin (86%)	(Roth, Karlsruhe; Nr. 7533.3)
Glycin	(Roth, Karlsruhe; Nr. 3908.3)
Hoechst 33342	(invitrogen, Molecular Probes, Karlsruhe; Nr. H3570)
Isopropanol	(Hedinger, Stuttgart über Apotheke Universitätsmedizin Mainz)
Kanamycin	(Roth, Karlsruhe; Nr. T832.2)
L-Arabinose	(Sigma-Aldrich, Schnelldorf; Nr. A-3256)
Methanol	(VWR, Darmstadt; Nr. 20874307)
Methylcellulose	(VWR, Darmstadt; Nr. 25499.182)
Milchpulver	(Roth, Karlsruhe; Nr. T145.3)
Mounting Medium	<i>Gel Mount Aqueous Mounting Medium</i> (Sigma-Aldrich, Schnelldorf; Nr. G0918-20ML)
Penicillin/Streptomycin	(GIBCO invitrogen, Karlsruhe; Nr. 15140 (10000U/ml Penicillin; 10000µg/ml Streptomycin))
Red Blood Cell Lysing Buffer	(Sigma-Aldrich, Schnelldorf; Nr. R7757)
RNase A	(QIAGEN, Hilden; Nr. 1007885)
ROX	(TIB MOLBIOL, Berlin)
Saccharose	(Roth, Karlsruhe; Nr. 4621.1)
N,N,N',N'-Tetraethyl- methylendiamin (TEMED)	(Roth, Karlsruhe; Nr. 2367.3)
Trypanblau	(Biochrom, Berlin; Nr. L6323)
Trypsin	(Serva, Mannheim; Nr. 37292)
Trypsin/EDTA	(GIBCO invitrogen, Karlsruhe; Nr. 15400)
Türks-Lösung	(Merck, Darmstadt; Nr. 1.09277)
Yeast Extract Servabacter	(Serva, Heidelberg; Nr. 24540)

2.1.4 Zellkulturmedien und Medienzusätze

Tab. 2.4: Zellkulturmedien und Medienzusätze

Reagenzien und Bezugsquelle	
1x MEM ⁺ + GlutaMax-I (<i>minimum essential medium</i>) (GIBCO invitrogen, Karlsruhe; Nr. 41090-028)	
FCS	10% (v/v)
L-Glutamin	2mM
Penicillin	100U/ml
Streptomycin	0,1mg/ml
10x MEM ⁺ + GlutaMax-I (GIBCO invitrogen, Karlsruhe; Nr. 21430-020) 10-fach konzentriertes Medium zum Ansetzen von Methylcellulose-Medium (s. 2.3.2)	
DMEM (<i>high glucose</i>) + GlutaMax-I (<i>Dulbecco´s modified eagle medium</i>) (GIBCO invitrogen, Karlsruhe; Nr. 61965-026)	
FCS	10% (v/v)
L-Glutamin	2mM
Penicillin	100U/ml
Streptomycin	0,1mg/ml
1x MEM ⁻ (GIBCO invitrogen, Karlsruhe; Nr. 21090-022) Medium ohne Zusätze zur Transfektion von BAC-Plasmiden (s. 2.2.5.2)	
FCS (Fetales Kälberserum)	(PAA, Cölbe; Nr. A15-151)
L-Glutamin	(GIBCO invitrogen, Karlsruhe; Nr. 25030)

2.1.5 Verwendete Antikörper

Tab. 2.5: Primäre Ak

Ak	Typ/Klon	immunisierte Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
α -E1	mAk (Cr103)	Maus	WB 1:2000	Dr. Stipan Jonjic, University of Rijeka, Croatia
α -gB	pAk (SA4403)	Kaninchen	WB 1:1000	Eurogentec, Köln
α -HA	mAk (16B12)	Maus	WB 1:2000 IF 1:500	HISS Diagnostics, Frei- burg; Nr. MMS-101R
α -HB-EGF	pAk	Ziege	WB 1:100	abcam; Nr. ab16783
α -H-2K ^d - α -Maus (PE)	mAK (IgG2a, κ)	Maus	2 μ l auf 5 \times 10 ⁵ Zellen	BD Pharmingen, Heidelberg; Nr. 553566
α -IE1	mAk (Cr101)	Maus	IHC 1:250 WB 1:2000	Dr. Stipan Jonjic, University of Rijeka, Croatia
α -IE2 (N)	pAk	Kaninchen	WB 1:250	Peptide Specialty Laboratories, Heidelberg
α -IgG2a κ Maus (PE)	mAk (G155-178)	Kaninchen	2 μ l auf 5 \times 10 ⁵ Zellen	BD Pharmingen, Heidelberg; Nr. 553457
α -m164-C	pAk	Kaninchen	WB 1:500	Holtappels <i>et al.</i> , 2006
α -MCP (M86)	pAk (Pep2-8)	Kaninchen	WB 1:500	Peptide Specialty Laboratories, Heidelberg

Ak	Typ/Klon	immunisierte Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
Normal-Serum	pAk	Kaninchen	IHC 1:10	invitrogen Life Technologies, Karlsruhe; Nr. 16120099

WB: Western Blot; IHC: Immunhistochemie; pAk, polyklonaler Ak; MCP, *major capsid protein*; N bzw. C, Ak, synthetisiert gegen das N- bzw. C-terminale Ende des Peptids; PE, Phycoerythrin.

Tab. 2.6: Sekundäre Ak

Ak	Typ/Klon	immunisierte Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
α -Maus	AF488	Ziege	IF 1:200	MoBiTec, Göttingen; Nr. A11001
α -Maus	HRP	Kaninchen	WB 1:10000	DAKO; Nr. P0260
α -Maus IgG	(Fab)-Biotin	Ziege	IHC 1:200	Sigma-Aldrich, Schnelldorf; Nr. B0529
α -Kaninchen	HRP	Schwein	WB 1:10000	DAKO; Nr. P0217
α -Ziege	HRP	Kaninchen	WB 1:10000	DAKO; Nr. P0449

WB, Western Blot; IHC, Immunhistochemie; mAk, monoklonaler Antikörper; pAk, polyklonaler Antikörper; HRP, *horse redding peroxidase*.

2.1.6 Enzyme

Tab. 2.7: Enzyme

Enzym	Hersteller
Calf Intestinal Phosphatase (CIP)	(New England Biolabs (NEB), Frankfurt a.M.; Nr. M1290L)
HotStar <i>Taq</i> DNA-Polymerase	(QIAGEN, Hilden; Nr. 203205)
ProofStart DNA Polymerase	(QIAGEN, Hilden; Nr. 202205)
Restriktionsendonukleasen	(NEB, Frankfurt a.M.) (Fermentas, St. Leon-Rot)

Enzym	Hersteller
Streptavidin-Alkalin Phosphat	(MABTECH, Nacka Strand, Schweden; Nr. 3310-10)
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	(QIAGEN, Hilden; Nr. 201205)
T4 DNA-Ligase	(Fermentas, St. Leon-Rot; Nr. EL0335)

2.1.7 Kits

Tab. 2.8: Kits

Kit	Hersteller
Annexin V-FITC/7-AAD Kit	(Beckman Coulter, Krefeld; Nr. IM3614)
BCA Protein Assay Kit	(Thermo Scientific, Pierce, Bonn; Nr. 23225)
DNeasy Blood & Tissue Kit	(QIAGEN, Hilden; Nr. 69506)
ECL Plus Western Blotting Detection Reagents	(GE Healthcare, München; Nr. RPN 2132)
High Pure PCR Product Purification Kit	(Roche, Mannheim; Nr. 11 732 676 001)
High Pure Viral Nucleic Acid Kit	(Roche, Mannheim; Nr. 11 858 874 001)
Mega Script Sp6	(Applied Biosystems/Ambion, Austin, Tx, USA; Nr. AM1330)
NucleoBond PC 500 Kit	(Macherey und Nagel, Düren; Nr. 740 574.25)
OneStep RT-PCR Kit	(QIAGEN, Hilden; Nr. 210212)
PolyFect Transfection Reagent	(QIAGEN, Hilden; Nr. 301107)
QIAGEN Plasmid Mini Kit	(QIAGEN, Hilden; Nr. 12125)
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	(QIAGEN, Hilden; Nr. 12163)
QIAquick Gel Extraction Kit	(QIAGEN, Hilden; Nr. 28704)
QIAshredder	(QIAGEN, Hilden; Nr. 79656)
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	(QIAGEN, Hilden; Nr. 204143)
RNase-Free DNase Set	(QIAGEN, Hilden; Nr. 79254)
RNeasy Mini Kit	(QIAGEN, Hilden; Nr. 74106)
Vectastain ABC-Peroxidase Kit	(Vector Laboratories, Burlingame, USA; Nr. PK-4000)

2.1.8 Verwendete Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden entweder von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) oder metabion (Martinsried) bezogen. Die Positionsangaben für mCMV-Sequenzen erfolgten nach

Rawlinson *et al.* (1996) (*GenBank Accession No.*: NC_004065). Bei anderen Sequenzen ist die *GenBank Accession* Nummer angegeben (Altschul *et al.*, 1990). Durch PCR eingebaute Restriktionsschnittstellen sind fett geschrieben. Die Amplifikatgrößen beziehen sich auf Amplifikationen eines DNA-*Templates*. Die *Primer* wurden in sterilem *Aqua bidest*, die Sonden in sterilem Tris/HCl pH 8,0 gelöst.

Tab. 2.9: Oligonukleotide zur Herstellung rekombinanter BAC-Plasmide mittels Zwei-Schritt Rekombinationsverfahren

Primer-Name	Sequenz 5' - 3'
primerDTRforw	n ['] 56-85; 5'-GGA GTT AAC CAT ATA AAA GCT GCT CCC CAT GCC ATT CGA ACC ATG AAG CTG CTG CCG TCG GTGG GTG CTG-3'
primerDTRrev2	n ['] 686-624; 5'-GGA GTT AAC TCA GTG GGA ATT AGT CAT GCC CAA CTT CAC TTT CTC TTC GTT TTC CAC ATC ATA ACC ACC TC-3'
	<i>GenBank Accession No.</i> : M93012
	Amplifikatgröße mit zusätzlichen Sequenzanhängen: 678bp

Tab. 2.10: Oligonukleotide zur Herstellung rekombinanter BAC-Plasmide mittels Ein-Schritt Rekombinationsverfahren

Primer-Name	Sequenz 5' - 3'
DTR_HA_for	n ['] 640-682; 5'-GGA AAA CGA AGA GAA AGT GAA GTT GGG CAT GAC TAA TTC CCA CTA CCC ATA CGA CGT CCC AGA CTA CGC TTG AAG GAC GAC GAC GAC AAG TAA-3'
	<i>GenBank No.</i> : M93012
DTR_HA_rev	n ['] 184342-184313; 5'-CTG GGG GGC TCC GTT CAC CCG CTC GTT AAC TCA CAG GAA CAC TTA ACG GCT GA-3'
	Amplifikatgröße: 1,195kbp

Tab. 2.11: Oligonukleotide zur sequentiellen Überprüfung der Mutationen im mCMV-BAC

Primer-Name	Sequenz 5' - 3'
ie2.3	n ['] 184623-184604; 5'-TGG GGT CTA AGG CAC AGA TC-3'
Na1x	n ['] 184168-184189; 5'-GCA AAT TAG GGG ATT TCA GTG C-3'
	Amplifikatgröße: ohne DTR 456bp; mit DTR 1043bp

Primer-Name	Sequenz 5' - 3'
IE1ex2A	n'181777-181756; 5'-TTT TTA GAG AGA TGG AGC CCG C-3'
IE1ex4	n'180697-180717; 5'-ACT GCC TTA GCC AGA TTC TCC-3' Amplifikatgröße: 1081bp
ie2_DTR_1	n'184738-184718; 5'-GCG GTC GCC ATC TTG TAT AGC-3'
ie2_DTR_3	n'337-319; 5'-GAC CGG AAA GTC CGT GAC TTG-3' <i>GenBank Accession No.:</i> M93012 Amplifikatgröße: 882bp

Tab. 2.12: Oligonukleotide zur Herstellung des DTR-Expressionsplasmids und zur Herstellung des DTR *in vitro*-Transkripts

Primer-Name	Sequenz 5' - 3'
DTR_for_HindIII	n'56-75; 5'-GGA AAG CTT ACC ATG AAG CTG CTG CCG TC-3' <i>GenBank Accession No.:</i> M93012
DTR_rev_BamHI	n'748-729; 5'-GGA GGA TCC GTC TGA GAT CCG GGT GGG AA-3' Position nach pBS-DTR-SV40pA Amplifikatgröße: 658bp

Tab. 2.13: Oligonukleotide für SYBR Green-Quantifizierungen

Primer-Name	Sequenz 5' - 3'
LCgB-For3	n'84017-84037; 5'-GAA GAT CCG CAT GTC CTT CAG-3'
LCgB-Rev3	n'84151-84131; 5'-AAT CCG TCC AAC ATC TTG TCG-3' Amplifikatgröße: 115bp
LCPTHrP-For2	5'-GGT ATC TGC CCT CAT CGT CTG-3'
LCPTHrP-Rev2	5'-CGT TTC TTC CTC CAC CAT CTG-3' <i>GenBank Accession No.:</i> M60056; n'186-206 Amplifikatgröße: 142bp

Tab. 2.14: Oligonukleotide für *TaqMan*-Quantifizierungen

Primer-Name	Sequenz 5' - 3'
BAC_taq_for	5'-GTT CTG TCA TGA TGC CTG CAA-3'
BAC_taq_rev	5'-AAT CCG CTC CAC TTC AAC GT-3'
	Amplifikatgröße: 81bp
gB_Taq_For2	n'83081-83099; 5'-GCC CGT CGG CAG TCT AGT C-3'
gB_Taq_Rev2	n'83161-83141; 5'-ATA CTC CGC GCG TTA AAA CAG-3'
	Amplifikatgröße: 80bp
DTR_Taq_For2	n'410-433; 5'-CAC GGA GAA TGC AAA TAT GTG AAG-3'
DTR_Taq_Rev2	n'532-554; 5'-CCA CAG CCA GGA TAG TTG TAT GG-3'
	Amplifikatgröße: 78bp
	<i>GenBank Accession No.:</i> M93012
IE1_Taq_For1	n'181184-181210; 5'-TGG CTG ATT GAT AGT TCT GTT TTA TCA-3'
IE1_Taq_Rev1	n'181438-181421; 5'-CTC ATG GAC CGC ATC GCT-3'
	Amplifikatgröße: DNA: 255bp; RNA: 133bp

Tab. 2.15: Fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide (*TaqMan*-Sonden) für quantitative PCR und quantitative RT-PCR

Primer-Name	Sequenz 5' - 3'
BAC-taq	5'-[6~FAM]CAC CGC ACG AAG ATT TCT ATT GTT CCT GA[TAMRA~6~FAM]-3'
gB-Taq	n'83175-83200; 5'-[6~FAM]TGC TCG GTG TAG GTC CTC TCC AAG CC[TAMRA~6~FAM]-3'
DTR_taq_P2	n'447-471; 5'-[6~FAM]CCT CCT GCA TCT GCC ACC CAG GTT A[BHQ-1]-3'
IE1_Taq_P1	n'181239-181249 (Exon 4), n'181372-181385 (Exon 3) 5'-[6~FAM] AAC GCT CCT CAC TGC AGC ATG CTT G [TAMRA~6~FAM]-3'

2.1.9 Verwendete Vektorsysteme und Plasmide

Tab. 2.16: Verwendete Vektorsysteme und Plasmide

Vektor/(BAC-) Plasmid	Größe [bp]	Anzucht	Res.	Kommentar
pUCAMB25	13280	37°C	Amp	enthält <i>ie1/3-ie2</i> -Fragment (Grzimek <i>et al.</i> , 2001)
pST76K_SR	6326	30°C	Kan	Pósfai <i>et al.</i> , 1997
pST76K_SR <i>ie1/3-ie2</i>	11884	30°C	Kan	Zwischen-Konstrukt
pST76K_SR_ΔIE2DTR	12471	30°C	Kan	Shuttle-Plasmid
pBS-DTR-SV40pA	3809	37°C	Amp	enthält Gen für simian DTR
pDrive_gB_PTHrP_BAC	7115	37°C	Amp	Standard zur absoluten Quantifizierung (Lemmermann <i>et al.</i> , 2010)
pcDNA TM 3.1/ <i>myc</i> -HisA	5493	37°C	Amp	Expressionsplasmid (invitrogen, Karlsruhe)
pcDNA TM 3.1/ <i>myc</i> - HisA_DTR	6121	37°C	Amp	DTR-Expressionsplasmid
pGP704-Kan	4700	37°C	Amp	<i>Amp^{Res}</i> , λ- <i>pir</i> -abhängige Replikation über R6Kγ <i>ori</i> , wächst nur in PIR1 <i>E.</i> <i>coli</i> , <i>Kan^{Res}</i> flankiert von zwei FRT-Sites
pSP64PolyA ⁺	3030	37°C	Amp	Ausgangs-Plasmid zur Herstellung von <i>in vitro</i> Transkripten
pSP64PolyA ⁺ _DTR	3649	37°C	Amp	Plasmid zur Herstel- lung des DTR- <i>in vitro</i> - Transkripts
mCMV-BAC-WT	230278	37°C	Cam	enthält vollständiges mCMV-Genom (Wagner <i>et al.</i> , 1999)
mCMV-BAC_ΔIE2DTR	230865	37°C	Cam	Virusrekonstitution

Vektor/(BAC-) Plasmid	Größe [bp]	Anzucht	Res.	Kommentar
mCMV-BAC-IE1L176A	230278	37°C	Cam	Ausgangs-BAC für mCMV-BAC- IE1L176A_ΔIE2DTR
mCMV-BAC- IE1L176A_ΔIE2DTR	230865	37°C	Cam	Virusrekonstitution

2.2 Zellbiologische Methoden

Alle Arbeiten, die Zellkultur betreffend, wurden unter sterilen Werkbänken (Heraeus, Hanau) durchgeführt, um Pilz- und Bakterienkontaminationen zu vermeiden. Die verwendeten Gefäße und Materialien wurden zuvor sterilisiert. Um ein optimales Klima für die Zellen zu gewährleisten, wurden diese in einem Brutschrank (Heraeus, Hanau) bei 37°C, CO₂-Belüftung (5%) und einer relativen Luftfeuchte von 95% inkubiert.

2.2.1 Verwendete Zellen und Zelllinien

2.2.1.1 COS-7

Die Etablierung von COS-Zelllinien wurde von Gluzman (1981) publiziert. Es handelt sich dabei ursprünglich um eine CV-1 Zelllinie, eine etablierte Nierenzelllinie von Grünen Meerkatzen, die für das lytische Wachstum des SV40-Virus permissiv ist. Diese Zelllinie wurde mit einer SV40-Mutante transfiziert, die eine Deletion von 6bp im Replikationsursprung aufweist und somit nicht mehr replikationsfähig ist. Als Kontrolle wurde Wildtyp-SV40-DNA transfiziert. 6 Wochen nach der Transfektion lysierten die mit Wildtyp-DNA transfizierten CV-1-Zellen durch virale Replikation. Bei der Transfektion mit der Mutante entstanden drei Zelllinien (COS-1, -3, -7), die alle das SV40-T-Antigen exprimieren und permissiv für die Infektion und Vermehrung von SV40-Virus sind. Die COS-7 Zelllinie wird in dieser Arbeit zur transienten Proteinexpression verwendet.

american type culture collection (ATCC); Nr. CRL 1651

Kulturmedium: DMEM + 10% (v/v) FCS

2.2.1.2 Murine Embryofetale Fibroblasten

Die primären murinen embryofetalen Fibroblasten (MEF) stammen aus 14 bis 17 Tage alten Embryonen des Mausstamms BALB/c. Die adhärennten Zellen sind permissiv für die Infektion mit dem mCMV, sowie allen abgeleiteten rekombinanten Viren. Sie werden für Zellkulturversuche in der zweiten oder dritten Passage infiziert.

Kulturmedium: MEM + 10% (v/v) FCS

2.2.2 Anlage von MEF-Kulturen

Das CMV ist ein Virus mit strikter Wirtsspezifität. Um einen reinen Virusstock herzustellen, benötigt man Zellen, die für eine mCMV-Infektion permissiv sind. Als hierfür geeignete Zellen haben sich Fibroblasten aus Mausembryonen herausgestellt. Weiterhin benötigt man die Zellen, um sie als Indikatorzellen für Zellkulturexperimente, wie z.B. einen Plaque-Assay, verwenden zu können.

Verwendete Materialien:

- Einfriermedium
 - FCS (fetales Kälberserum) 90% (v/v)
 - DMSO (Dimethylsulfoxid) 10% (v/v)
- Trypsin/EDTA pH 6,4
 - Trypsin 1,25g
 - EDTA×2H₂O 1,25g
 - mit PBS auffüllen ad 1000ml
 - pH-Wert einstellen mit 1M NaOH und steril filtrieren.
 - Bei 4°C ist die Lösung mehrere Monate haltbar.

Durchführung:

Einer trächtigen BALB/c-Maus wurden am Tag 14 bis 17 die Embryonen steril entnommen und sofort in eine Zellkulturschale auf Eis gelegt. Nach dem Entfernen der inneren Organe, der Augenanlagen und des Gehirns, wurde das restliche Gewebe mit einer Schere oder einem Skalpell zerkleinert. Das Gewebehomogenat wurde in 30ml PBS und Trypsin/EDTA pH 6,4 (v/v 1:1) aufgenommen, in einen 300ml Erlenmeyerkolben mit Glasperlen (Ø 1mm bis 2mm) und einem Magnetrührstäbchen überführt und für 30min bei 37°C vorsichtig gerührt. Danach wurden erneut je 15ml PBS und Trypsin/EDTA pH 6,4 hinzugegeben und ein weiteres Mal unter Rühren bei 37°C inkubiert. Insgesamt wurde dieser Vorgang dreimal wiederholt. Die Zellsuspension wurde anschließend über ein steriles Metallsieb in ein Becherglas überführt und das Filtrat 10min bei 302×g (Heraeus Megafuge 2.0, Rotor: 8160) in einem 50ml-Zentrifugenröhrchen pelletiert. Die

Zellen wurden mit 50ml Medium gewaschen und wieder zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10ml Kulturmedium resuspendiert, über ein steriles Zellnylonsieb (100µm) gegeben und die Zellzahl bestimmt (s. 2.2.4).

Die Aussaat der MEF erfolgte in beschichteten Zellkulturschalen (Ø 15cm) in einer Dichte von 2×10^7 bis 3×10^7 Zellen pro 30ml (Passage 0). Am nächsten Tag wurden die Zellen dreimal mit jeweils 10ml PBS gewaschen, um nicht adhärenente Zellen wie z.B. Erythrocyten, zu entfernen, und anschließend wurden 30ml Kulturmedium auf die Zellen gegeben.

Nach 2 bis 4 Tagen, wenn sich ein konfluenten Zellrasen gebildet hat, wurde das Kulturmedium abgenommen, die Zellen mit PBS gespült, mit 3ml Trypsin/EDTA (0,05%; pH 7,4) abgelöst und entweder in Einfriermedium zu drei bis vier Aliquots pro 15cm-Zellkulturschale eingefroren (Passage 1) oder in Kulturmedium aufgenommen und durch Splitten der Zellen in Passage 2 überführt. Für alle Zellkulturversuche wurden ausschließlich Zellen bis Passage 3 verwendet.

2.2.3 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen

Um Zellen über einen längeren Zeitraum lagern zu können, wurden diese in flüssigem Stickstoff bei -196°C eingefroren. Das Einfriermedium enthält DMSO, um durch seine hygroskopische Wirkung Zellschäden durch Kristallbildung beim Einfrieren zu verhindern.

Verwendete Materialien:

- Einfriermedium (s. 2.2.2)

Durchführung:

Zum Einfrieren wurden die Zellen zunächst pelletiert und anschließend mit kaltem Einfriermedium auf eine Zellzahl von 1×10^6 bis 5×10^6 Zellen/ml eingestellt und in 1ml-Aliquots in Einfrierröhrchen eingefroren. Dazu wurden die Aliquots zuerst in Papiertücher eingewickelt und langsam auf -70°C abgekühlt und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

Zur Rekultivierung wurden die Zellen schnell bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und anschließend mit ca. 50ml Kulturmedium gewaschen, um das toxische DMSO auszuwaschen. Nach der Zentrifugation ($302 \times g$; Heraeus Megafuge 2.0, Rotor: 8160) wurden die Zellen in frischem Kulturmedium resuspendiert und schließlich in beschichteten Zellkulturschalen ausgesät.

2.2.4 Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität

Vitalitätstests werden verwendet, um den Anteil vitaler Zellen innerhalb einer Zellsuspension angeben zu können. Der Vitalitätstest mit Trypanblau (Biochrom, Berlin) beruht auf der veränderten Membrandurchlässigkeit abgestorbener Zellen, bei der Farbstoffe, für die die Zellmembran normalerweise undurchlässig ist, aufgenommen werden. Zellmembranen vitaler Zellen sind dagegen für derartige Stoffe impermeabel. Trypanblau ist ein anionischer Azofarbstoff, der leicht an Zellproteine bindet und somit das Cytoplasma der toten Zellen unter dem Mikroskop blau erscheinen lässt.

Um mononukleäre Zellen auszuzählen, wurde die Türks-Lösung (Merck, Darmstadt) verwendet. Dabei werden die Erythrocyten durch die in der Lösung enthaltene Essigsäure hämolysiert und die Kerne der kernhaltigen Zellen durch den enthaltenen Farbstoff angefärbt.

Durchführung:

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde ein Aliquot der zu bestimmenden Zellsuspension in geeigneter Verdünnung mit der Färbelösung gemischt und in eine Neubauer-Zählkammer (Kammertiefe 0,1mm) überführt. Nach dem Auszählen der Zellen in einem Großquadrat, bestehend aus 16 Kleinquadraten, erfolgte die Berechnung der Zellzahl pro ml wie folgt:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{gezählte Zellen} \times V \text{ (V: Verdünnungsfaktor)} \times 10^4 \text{ (Kammerfaktor)}$$

2.2.5 Rekonstitution von Viren

2.2.5.1 Transfektion von Säugerzellen mit Dendrimern

Das zur Transfektion verwendete PolyFect-Reagenz (QIAGEN, Hilden) ist ein Dendrimer, das eine definierte sphärische Struktur mit Verzweigungen besitzt, die von einem zentralen Kern ausgehen und durch positiv geladene AS terminiert werden. Polykationische Dendrimere binden die Plasmid-DNA und kondensieren diese zu einer kompakten Struktur, die die Aufnahme der DNA in die Zelle optimiert. Der Dendrimer-DNA-Komplex besitzt insgesamt eine positive Ladung, die die Bindung an negativ geladene Rezeptoren auf der Oberfläche von eukaryontischen Zellen erlaubt. In der Zelle selbst puffert das Dendrimer den pH-Wert des Lysosoms und führt zur Inhibierung von lysosomalen Nukleasen und dadurch zur Stabilisierung des DNA-Komplexes und schließlich zum Transport intakter DNA in den Kern.

2.2.5.2 Transfektion von BAC-Plasmid-DNA

Durchführung:

Zur Rekonstitution von rekombinanten mCMV wurden Zellen in 6-*well*-Zellkulturplatten ausgesät. Um MEF mit der BAC-DNA (BAC, *bacterial artificial chromosome*) transfizieren zu können, sollten diese zu 60% bis 70% konfluent sein. Die Transfektion erfolgte mit Hilfe des PolyFect-Reagenzes (QIAGEN, Hilden) mit gereinigter BAC-DNA (s. 2.4.4.5). Die Transfektionsansätze wurden mit unterschiedlichen Mengen an BAC-DNA angesetzt (s. Tab. 2.17), die mit abgeschnittenen Spitzen zum Kulturmedium gegeben wurde. Durch Invertieren wurden die Ansätze gemischt und zur Bildung der DNA-Komplexe für 10min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert.

Tab. 2.17: Transfektionsschema

Ansatz	1	2	3	4	5	6
BAC-DNA	2,5µl	5µl	10µl	15µl	–	–
MEM ⁻	97,5µl	95µl	90µl	85µl	100µl	–
PolyFect	10µl	10µl	10µl	10µl	10µl	–

In der Zwischenzeit wurde das Medium von den MEF abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend 1,5ml Kulturmedium auf die Zellen pipettiert. Nach der Inkubationszeit wurden je 600µl Kulturmedium zu den Transfektionsansätzen gegeben und diese sofort zu den Zellen pipettiert und bei 37°C inkubiert. Nach ungefähr 7h erfolgte ein Mediumwechsel, bei dem die Zellen mit je 3ml neuem Kulturmedium überschichtet wurden. 4 bis 6 Tage nach erfolgreicher Transfektion traten erste Plaques auf. Bei vollständiger Lyse des Zellrasens wurden die Überstände abgenommen und zum Entfernen der Zelltrümmer zentrifugiert (5min; 4°C bei 500×g; Heraeus Labofuge 400R, Rotor: 8172). Die Virusüberstände wurden gesammelt und bei -70°C gelagert oder zur Entfernung der BAC-Sequenz (s. 2.3.2) weiter passagiert.

Nähere Angaben sind dem Firmenprotokoll unter <http://www1.qiagen.com/Products/Transfection/TransfectionReagents/PolyFectTransfectionReagent.aspx> zu entnehmen.

2.2.6 DT-Behandlung von infizierten MEF

MEF, die mit einer DTR-Virusmutante infiziert wurden, sind suszeptibel für DT. Das DT wird nach der Infektion in einer Endkonzentration von 100ng/ml zu den Zellen gegeben.

Das lyophilisierte DT (Sigma-Aldrich, Schnelldorf) kann bei 4°C gelagert werden und wird vor dem Gebrauch in 1ml PBS gelöst, sodass die Stocklösung eine Konzentration von 1mg/ml hat. Die Stocklösung wird zu je 5µl, 10µl und 20µl aliquottiert und bei -70°C gelagert. Für Zellkulturversuche wird die Arbeitslösung in einer Endkonzentraion von 100ng/ml (s. Abb. 3.22) immer frisch in Kulturmedium angesetzt und der verbleibende Rest verworfen.

2.2.7 Cytofluorometrische Methoden

Das Prinzip der Durchflusscytometrie (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) beruht auf der Emission von optischen Signalen durch die Zelle, wenn diese einen Laserstrahl passiert. Dieses Verfahren ermöglicht es, bestimmte Proteine außerhalb oder innerhalb der Zelle zu quantifizieren. Die in einer Zellsuspension befindlichen Zellen werden mit einem Ak gegen ein spezifisches Protein beladen und durch eine Kapillare gesaugt. Beim Passieren des Laserstrahls werden die fluoreszierenden Farbstoffe angeregt und streuen einen Teil des Lichts, welches über ein Linsensystem mit speziellen Filtern auf Detektoren (meist *photomultiplier*) gelenkt wird. Diese Signale werden so detektiert, verstärkt und in ein elektrisches Signal umgewandelt, bevor sie am Computer graphisch dargestellt werden können. Durch die Streuung des Lichts seitens der Zelle kann zusätzlich eine Aussage über die Größe und Granularität der Zelle getroffen werden. Die Menge des gestreuten Lichts (Vorwärtsstreulich; *forward scatter*, FSC) korreliert mit der Größe der Zelle. Das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) ist ein Maß für die Beugung des Lichts im rechten Winkel, das von der Granularität der Zelle, sowie der Größe und Struktur des Zellkerns beeinflusst wird.

2.2.7.1 Apoptosemessung durch Annexin V und 7-AAD Färbung

Apoptose ist eine Form von programmiertem Zelltod, charakterisiert durch morphologische Veränderungen wie z.B. in der Plasmamembran den Verlust der Membran Asymmetrie und des Anhaftens, Schrumpfen der Zelle, Chromatin Kondensation und chromosomale DNA-Fragmentierung (Wyllie *et al.*, 1984). Die Änderungen in der Plasmamembran der Zelloberfläche sind eines der ersten Zeichen von Zellen, die in Apoptose gehen (Martin *et al.*, 1995). In diesen Zellen wird das membranständige Phospholipid Phosphatidylserin (PS) von der inneren zur äußeren Seite der Plasmamembran translokiert, wodurch das PS in der externen zellulären Umgebung präsentiert wird (Fadok *et al.*, 1992; Verhoven *et al.*, 1995). Annexin V ist ein 35kDa bis 36kDa Ca²⁺-abhängiges Phospholipid bindendes Protein, das eine hohe Affinität für das PS besitzt und an Zellen bindet, die PS exponieren (Vermes *et al.*, 1995). Dadurch stellt sich Annexin V als sehr sensibler Marker zur Identifizierung von apoptotischen Zellen dar. Da Annexin V typischerweise an ein Fluorochrom wie z.B. Fluorescein Isothiocyanat (FITC) gebunden ist, können apoptotische Zellen mittels Durchflusscytometrie detektiert werden.

Da die Translokation von PS zur extrazellulären Zelloberfläche auch bei nekrotischen Zellen zu beobachten ist, muss Annexin V in Kombination mit einem Farbstoff angewendet werden, der tote Zellen markiert, um diese unterscheiden zu können. In dieser Arbeit wurde hierzu 7-AAD verwendet, das leicht in Zellen eindringt, deren Membran geschädigt ist, und sich zwischen Guanin-Cytosin-Basenpaare der DNA einlagert. In Zellen mit intakter Zellmembran kann dieser Farbstoff nicht eindringen. Apoptotische Zellen sind demnach Annexin V-positiv, 7-AAD-negativ und nekrotische tote Zellen sind Annexin V-positiv, sowie 7-AAD-positiv.

2.2.7.2 Infektion und Färben der Zellen

Um Apoptose in den Zellen zu induzieren, wurden diese mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 4 (MOI=4) mit der Virusmutante mCMV_ Δ IE2DTR bzw. dem mCMV-WT.BAC zentrifugal infiziert, DT in einer Endkonzentration von 100ng/ml direkt nach der Infektion zu den Zellen gegeben (s. 3.5.6.3) und bei 37°C inkubiert. Zu bestimmten Zeiten nach der Infektion wurde sowohl der Zellkulturüberstand, als auch die Zellen von der Zellkulturschale abgelöst, in PBS aufgenommen und die Zellzahl bestimmt (s. 2.2.4). Anschließend wurde die Zellsuspension für 10min bei 150×g (Eppendorf centrifuge 5417C, Rotor: F 45-30-11) zentrifugiert und die Zellzahl auf 5×10^5 Zellen/100µl in Bindepuffer eingestellt.

Verwendete Materialien:

- Bindepuffer

Hepes (pH 7,5)	10mM
NaCl	140mM
CaCl ₂ ×2H ₂ O	2,5mM
mit H ₂ O	ad 100ml

Lösung steril filtrieren und bei 4°C lagern.

- Annexin V-FITC/7-AAD Kit
- IgG-PE
- α -H-2K^d

Durchführung:

Je 100µl der Zellsuspension (5×10^5 Zellen) wurden mit 2µl eines gegen K^d gerichteten Ak (α -H-2K^d) bzw. IgG-PE (Isotypkontrolle) gefärbt und für 15min bei 4°C inkubiert. Danach wurde je 1ml Bindepuffer zu den Zellen gegeben und zentrifugiert (720×g; Eppendorf centrifuge 5417C, Rotor: F 45-30-11). Der Überstand wurde entfernt und das Zellpräzipitat in 100µl Bindepuffer aufgenommen. Die Färbung mit 7µl Annexin V-FITC und 10µl 7-AAD erfolgte direkt

in Bindepuffer für 15min im Dunkeln. Nach Zugabe von 400µl Bindepuffer konnten die Proben im Durchfluscytometer analysiert werden.

2.2.8 Herstellung einer Einzelzellsuspension aus Lungenzellen

Verwendete Materialien:

- PBS/Heparin-Lösung (10U/ml)

Heparin (25000IE/5ml) 500µl

PBS ad 500ml

Die Lösung wird bei 4°C gelagert; Verwendung im Tierversuch bei RT.

- Kanüle (0,45×12mm)

- Peristaltikpumpe

- GBSS-Puffer (*Gey's balanced salt solution*)

NaCl 137mM

KCl 5mM

CaCl₂×2H₂O 1,6mM

MgCl₂×6H₂O 0,9mM

MgSO₄×7H₂O 0,3mM

KH₂PO₄ 0,3mM

Na₂HPO₄×2H₂O 0,2mM

NaHCO₃ 1,7mM

D(+) Glucose Monohydrat 5,5mM

Hepes 50mM

Aqua bidest ad 5l

GBSS-Puffer auf pH 7,4 einstellen, steril filtrieren und bei 4°C lagern.

- GBSS-Puffer mit Kollagenase A und DNase (Typ1)

GBSS-Puffer 30ml

Kollagenase A 0,05%

DNase (2000U/mg) 1000-2000U

Zuerst wird Kollagenase A zum GBSS-Puffer gegeben und dieser steril filtriert.

Anschließend wird der Puffer mit DNase versetzt.

Der Puffer wird frisch angesetzt und vor dem Gebrauch auf 37°C erwärmt.

- Red Blood Cell Lysis Buffer (Sigma-Aldrich, Schnellendorf)

Durchführung:

Die Mäuse wurden mit CO₂ narkotisiert und anschließend wurden der Bauchraum und der Halsbereich freigelegt. Um ausschließlich den kleinen Lungekreislauf zu spülen, wurden *Vena* und

Arteria subclavia, *Aorta abdominalis* und *Vena cava inferior* inzisiert. Anschließend wurde das Herz punktiert und der kleine Lungenkreislauf so lange mit PBS/Heparin-Lösung gespült, bis eine deutliche Volumenzunahme und Weißfärbung der Lunge zu sehen war. Die Lungenperfusion wurde durchgeführt, um intravasale Blutzellen zu entfernen. Die Lunge wurde entnommen, Tracheen und Bronchien entfernt und die Lunge mit einer kleinen Schere oder einem Skalpell zu einer homogenen Masse zerkleinert. Zur Bestimmung der DNA-Load (s. 2.4.14.1) in der Lunge wurde zuvor der postkavale Lobus entnommen und bei -70°C gelagert und die DNA mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit (s. 2.4.4.6) isoliert. Das Homogenat wurde in einen Erlenmyerkolben überführt und das Bindegewebe schüttelnd ($150\text{U}/\text{min}$) für 1h bei 37°C in 30ml GBSS-Puffer mit Kollagenase A und DNase verdaut. Anschließend wurde die Zellsuspension über ein Metallsieb gegeben und mit dem Stempel einer 2ml-Pipette zerrieben. Das Sieb wurde gründlich mit GBSS-Puffer gespült, die Zellsuspension in ein 50ml-Zentrifugenröhrchen überführt und 10min bei $552\times g$ (Heraeus Megafuge 2.0, Rotor: 8160) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde zweimal mit GBSS-Puffer gewaschen. Zur Lyse der Erythrocyten wurden 2ml Red Blood Cell Lysing Buffer zu den Zellen gegeben, diese darin resuspendiert und für 2min unter gelegentlichem Schütteln bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen ein weiteres Mal mit GBSS-Puffer gewaschen, in GBSS-Puffer aufgenommen, über ein Zellnylonsieb gegeben und abschließend für 10min bei $552\times g$ (Heraeus Megafuge 2.0, Rotor: 8160) zentrifugiert. Die Zellen wurden in einem geeigneten Volumen an GBSS-Puffer resuspendiert, die Zellzahl bestimmt (s. 2.2.4) und auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt.

2.3 Virologische Methoden

2.3.1 Verwendete Viren

MW97.01 (mCMV-WT.BAC):

Diese chimäre mCMV-Rekombinante besteht überwiegend aus der Nukleotidsequenz des Laborstamms ATCC VR-1399 (Smith, 1954) und einem Anteil der Nukleotidsequenz (*Hind*III-E'-Fragment) des mCMV-Laborstammes K181 (Misra and Hudson, 1980). Nach Klonierung des gesamten mCMV-Genoms in ein BAC-Plasmid (pSM3fr (Wagner *et al.*, 1999; Messerle *et al.*, 1997)) und anschließender Transfektion in MEF, konnte das Virus MW97.01 (mCMV-WT.BAC, WT) (Wagner *et al.*, 1999) nach erfolgreicher Rekonstitution aus dem Überstand isoliert werden (Wagner *et al.*, 1999). MW97.01 *in vivo*-Experimente zeigten keine Unterschiede in den biologischen Eigenschaften im Vergleich zu mCMV-WT.Smith (Stamm Smith ATCC VR-194/1981) (Wagner *et al.*, 1999). mCMV-WT.BAC wurde unserer Arbeitsgruppe freundlicherweise von U. H. Koszinowski, Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Mikrobiologie in München, zur Verfügung gestellt.

mCMV_ΔIE2DTR:

Das rekombinante Virus mCMV_ΔIE2DTR unterscheidet sich vom WT durch das zusätzliche Vorhandensein eines für den simian DTR kodierenden Gens. Das *DTR*-Gen wurde bei der Klonierung mittels Zwei-Schritt BAC-Mutagenese über die *HpaI*-Schnittstellen an Position n 184237 und n 184315 (WT, *GenBank Accession No.* NC_004065) in das mCMV-Genom kloniert, wodurch der *ie2*-Promotor und 43bp des Exon 1 aus *ie2* deletiert wurden. Durch die Amplifizierung des *DTR*-Gens wurde jedoch die *ie2*-Promotor-Sequenz wieder vollständig durch das *Primer*-Design (s. Abb. 3.4) in das mCMV-Genom integriert und ein Stop-Codon hinter das *DTR*-Gen kloniert. Der DTR steht somit unter Kontrolle des *ie2*-Promotors.

mCMV-IE1L176A_ΔIE2DTR:

Dieses Virus basiert auf der Funktionverlustmutante mCMV-IE1L176A, die eine gezielte Punktmutation (L176A an der Position n 181.020 und n 181.022, Positionsangabe nach Rawlinson *et al.*, 1996) in der C-terminalen MHC Klasse I (hier L^d) Anker-AS des IE1-Peptids (168-YPHFMPTNL-176, Reddehase *et al.*, 1989) enthält, wodurch die Präsentation des IE1-Peptids durch den MHC verhindert wird (Simon *et al.*, 2006a). Zusätzlich wurde, wie bei der Mutante mCMV_ΔIE2DTR, das Gen für den simian DTR unter Kontrolle des *ie2*-Promotors gestellt.

mCMV_ΔIE2DTR-HA:

Diese Virusmutante enthält am 3'-Ende des insertierten *DTR*-Gens (s. mCMV_ΔIE2DTR) eine HA-Epitop-Sequenz (YPYDVPDYA) aus dem Hämagglutinin-Protein (HA) des Influenza-Virus. Das ursprüngliche Stop-Codon des *DTR*-Gens wurde unter gleichzeitiger Insertion des HA-tags mittels Ein-Schritt BAC-Mutagenese entfernt und hinter dem HA-tag wieder eingefügt.

2.3.2 Eliminierung von BAC-Sequenzen aus rekombinanten mCMV

Nach der Rekonstitution von rekombinanten mCMV aus BAC-DNA (s. 2.2.5.2) ist es wichtig, die im viralen Genom vorhandenen BAC-Vektor-Sequenzen zu entfernen, da diese zu veränderten biologischen Eigenschaften der rekombinanten Viren im Vergleich zum WT führen können (Wagner *et al.*, 1999; Adler *et al.*, 2001). Die BAC-Vektor-Sequenzen im mCMV-BAC-Plasmid sind von homologen viralen Sequenzen flankiert, die mit Hilfe des eukaryontischen Rekombinationsapparats mittels homologer Rekombination eliminiert werden können. Es entsteht ein authentisches WT-Genom, das frei von BAC-Vektor-Sequenzen ist (Wagner *et al.*, 1999). Dieser Vorgang benötigt vier bis fünf Zellkulturpassagen, um den größten Anteil an BAC-Sequenzen zu entfernen und einen BAC-DNA-freien mCMV-Stock zu erhalten.

Verwendete Materialien:

• Methylcellulose-Medium (MC)

Methylcellulose	8,8g
<i>Aqua bidest</i>	360ml
Autoklavieren und üN bei 4°C rühren.	
MEM 10×	40ml
L-Glutamin	5ml
Penicillin/Streptomycin (P/S)	5ml
FCS	20ml
pH-Wert mit NaHCO ₃ auf 7,5 einstellen.	

Durchführung:

Die Virusüberstände wurden in 6-*well*-Zellkulturplatten passagiert, indem MEF wiederholt mit den jeweiligen Überständen infiziert wurden. Dazu wurden diese durch Zentrifugation (5min; 500×g; 4°C; Heraeus Labofuge 400R, Rotor: 8172) von Zelltrümmern befreit und MEF (ca. 80% konfluent) mit jeweils 1µl des Virusüberstands, verdünnt in 999µl frischem Kulturmedium, infiziert. Der restliche Überstand wurde bei -70°C weggefroren. Zur Infektion der MEF wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen mit 1ml der Viruslösung bedeckt und der Ansatz für 30min bei RT unter gelegentlichem Schwenken inkubiert. Anschließend wurden jeweils 2ml Kulturmedium auf die Zellen gegeben und diese für 4 bis 5 Tage bei 37°C inkubiert, bis der Zellrasen zu etwa 80% durchlysiert war. Dieser Vorgang wurde für drei Virus-Passagen durchgeführt. 1ml Viruslösung der vierten Passage wurde mit 2ml MC überschichtet, um nach 3 bis 5 Tagen einzelne Virusplaques isolieren zu können. Diese Einzelplaques wurden von der Unterseite der Kulturplatte unter einem Mikroskop mit einem Stift markiert und einige Zellen des Plaques mit einer sterilen, abgeschnittenen 1ml-Pipettenspitze entnommen und in 1ml Kulturmedium resuspendiert. Die weitere Infektion der MEF erfolgte wie oben beschrieben. Nach der Lyse der Zellen wurden die jeweiligen Überstände gesammelt. Ein Aliquot des Überstands diente zur Isolierung viraler DNA (s. 2.4.4.7) und anschließender Überprüfung rekombinanter mCMV auf eventuell noch verbleibende BAC-Sequenzen mittels einer quantitativen *real-time* PCR (qPCR) (s. 2.4.14.3) mit BAC-spezifischen Oligonukleotiden und Sonde. Das rekombinante mCMV wurde als BAC-frei definiert, wenn weniger als 100 BAC-Sequenzen pro 1×10^6 Virusgenomen nachweisbar waren.

2.3.3 mCMV-Produktion

Die Generierung hochreiner mCMV-Stocks erfolgte, nachdem die BAC-Sequenzen durch Passagierung aus dem Virusgenom entfernt worden waren (s. 2.3.2).

Verwendete Materialien:

• Virus-Standard-Puffer (VSP)

Tris	50mM
EDTA×2H ₂ O	5mM
KCl	12mM
<i>Aqua bidest</i>	ad 1000ml

Lösung mit HCl auf pH 7,8 einstellen und anschließend autoklavieren.

• VSP mit 15% (w/v) Saccharose

Saccharose	15g
mit VSP	ad 100ml

Die Lösung frisch ansetzen und steril filtrieren.

Durchführung:

Zur Produktion von gereinigtem Virus benötigt man 40 bis 55 beschichtete Zellkulturschalen (Ø 15cm) mit fast konfluent bewachsenen MEF der dritten Passage. Die Zellen wurden mit 1×10^5 PFU (*plaque forming unit*) mCMV pro Zellkulturschale oder mit 50µl Virusüberstand einer durchlysierten Kultur einer 10cm-Zellkulturschale infiziert. Dazu wurde das Medium abgenommen und das Virus in einem Volumen von 5ml pro Schale auf die Zellen pipettiert und unter mehrmaligem Schwenken 30min bei RT inkubiert. Anschließend wurden pro Schale 20ml Medium hinzu pipettiert. Die infizierten Zellen wurden 4 bis 5 Tage bei 37°C im Brutschrank inkubiert, bis sich ca. 80% der Zellen abgelöst hatten und im Überstand befanden. Noch adhärenente Zellen wurden mit einem sterilen Zellschaber abgelöst und die Zellsuspension in sterilen 500ml-Zentrifugenbechern gesammelt. Anschließend wurde bei $6370 \times g$ für 20min bei 4°C zentrifugiert (Sorvall RC 5C Plus, Rotor: SLA-3000). Alle weiteren Schritte erfolgten bei 4°C bzw. auf Eis.

Die Überstände wurden nach der Zentrifugation in 250ml-Zentrifugenbechern gesammelt und die Pellets mit 10ml kaltem Medium ohne FCS resuspendiert und mit dem *dounce*-Homogenisator auf Eis homogenisiert. Das Homogenat wurde anschließend in 50ml-Zentrifugenröhrchen überführt und bei $3.670 \times g$ und 4°C für 20min zentrifugiert (Sorvall RC 5C Plus, Rotor: SS-34). Die Überstände wurden mit den bereits vorhandenen Überständen vereint und die Pellets verworfen. Die gesammelten Überstände wurden für 3h bei $26.000 \times g$ und 4°C zentrifugiert (Sorvall RC 5C Plus, Rotor: SLA-1500), die Überstände vorsichtig dekantiert und die Pellets zum Lösen über Nacht (üN) auf Eis gestellt. Am nächsten Tag wurden die Pellets im verbliebenen Medium resuspendiert und ein weiteres Mal auf Eis mit dem *dounce*-Homogenisator homogenisiert. Das Homogenat wurde vorsichtig auf ein kaltes VSP/Saccharose-Kissen (15%-ige Saccharose (w/v)) in einem Puffer-zu-Virus Verhältnis von 10:1 (v/v) in ein steriles Polyallomerröhrchen

gegeben. Anschließend wurde für 1h bei 4°C mit 52.800×g zentrifugiert (Sorvall Combi Plus, Rotor: AH629) und der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgenommen. Das Pellet wurde mit 2ml bis 4ml eiskaltem Saccharose/VSP-Puffer überschichtet und zum Lösen ungefähr 3h auf Eis gestellt. Danach wurde das Pellet mit einer Pasteurpipette sorgfältig resuspendiert und ein weiteres Mal auf Eis homogenisiert. Die Virussuspension wurde in Aliquots zu 10µl, 20µl und 100µl bei -70°C gelagert.

2.3.4 mCMV-Titerbestimmung

Der mCMV-Virustiter wird in PFU angegeben. Eine PFU ist nach Definition die Menge an Virus, die benötigt wird, um einen einzelnen Plaque in einem Monolayer permissiver Zellen zu erzeugen. Die Berechnung erfolgt über folgende Formel:

$$\text{Virustiter (PFU/ml)} = \text{Plaqueszahl} \times V \text{ (V: Verdünnungsfaktor)} \times 10$$

Die Ergebnisse der Duplikate/Triplikate wurden bei der Berechnung gemittelt. Die errechneten Werte ergaben den Virustiter pro ml bzw. Organ (Reddehase *et al.*, 1985).

Verwendete Materialien:

- MC (s. 2.3.2)

2.3.4.1 Virustiterbestimmung aus Zellkulturüberständen

Durchführung:

Zur Virustiterbestimmung wurden MEF der dritten Passage in 48-well-Zellkulturplatten angelegt. Zur Titration der Zellkulturüberstände wurde in Reaktionsgefäße 180µl Kulturmedium vorgelegt und 20µl des Virusstocks hinzupipettiert und weiter bis zu einer Verdünnung von 1:10⁻⁹ titriert. Die gesamte Virustitration erfolgte auf Eis und mit gekühltem Medium. Das Kulturmedium der MEF wurde abgesaugt und je 100µl jeder Verdünnungsstufe wurden als Duplikat bzw. Triplikat auf die MEF gegeben. Für eine sorgfältige Titration muss nach jedem Pipettiervorgang die Spitze gewechselt werden, bevor sie in das Medium getaucht wird. Nach 1h Inkubation bei 37°C wurden die Zellen mit 500µl MC (s. 2.3.2) überschichtet, um die Diffusion von freigesetzten Virionen zu erschweren. Die Auswertung erfolgte nach 4 bis 5 Tagen durch Auszählen der Plaques mittels eines Invertmikroskops.

2.3.4.2 Virustiterbestimmung aus Organhomogenaten

Die Virustiterbestimmung aus Organhomogenaten erfolgte ebenfalls auf MEF der dritten Passage, die auf 48-*well*-Zellkulturplatten ausgesät worden waren. Vier Organe können pro Platte als Duplikate titriert werden. Hierzu wurden die entnommenen Organe bei 37°C aufgetaut und anschließend über einem sterilen Metallsieb mit dem Stempel einer 2ml-Spritze homogenisiert, das Sieb mit 2ml Medium gespült und eine \log_{10} -Verdünnungsreihe mit sechs Verdünnungsstufen erstellt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden 100µl je *well* auf MEF gegeben und zentrifugal infiziert (s. 2.3.5). Nach der Zentrifugation wurden je 500µl MC in die *wells* gegeben und bei 37°C inkubiert. Das Auszählen der Plaques erfolgt nach 4 Tagen (Podlech *et al.*, 2002).

2.3.5 Zentrifugale Infektion von MEF

Die Infektion permissiver Zellen mit mCMV kann durch Zentrifugation um einen Faktor von ungefähr 20 (in unten stehender Formel 0,2 PFU) verstärkt werden (Kurz *et al.*, 1997; Podlech *et al.*, 2002).

Verwendete Materialien:

- MC (s. 2.3.2)

Für die zentrifugale Infektion von MEF wurden diese in der zweiten oder dritten Passage in verschiedenen Zellkulturplatten (6-, 24-, 48-*well*-Platte) oder Zellkulturschalen (Ø10cm) ausgesät. Vor der Infektion wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend nach Zugabe der Viruslösung in Kulturmedium für 5min bei 760×g (Heraeus Megafuge 2.0, Rotor: 8160 bzw. 8082) zentrifugiert. Danach wurden die Platten um 180° gedreht und für 25min bei 760×g zentrifugiert. Die Platten wurden anschließend entweder mit Medium supplementiert oder mit MC überschichtet.

Die benötigte Virusmenge für eine Infektion mit einer $MOI=4$ berechnet sich wie folgt:

$$\text{Zellzahl} \times 0,2 \text{ PFU} = \text{benötigte PFU des Virusstocks}$$

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Verwendete Bakterienstämme

DH10B (invitrogen, Karlsruhe)

Genotyp: F^- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Δ *lacX74* *deoR* *endA1* *ara* Δ 139 Δ (*ara, leu*)7697 *rpsL* *recA1* *nupG* Φ 80/*lacZ* Δ M15 *galU* *galK*

SW105

Genotyp: F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Δ *lacX74* *deoR* *endA1* *ara* Δ 139 Δ (*ara*, *leu*)7697
rpsL *recA1* *nupG* Φ 80d*lacZ* Δ M15 *galU* Δ *galK* [λ c1857(*cro-bioA*)<>Tet]*galK*⁺ *gal490*

2.4.2 Bakterienanzucht**2.4.2.1 Flüssigkulturen**Verwendete Materialien:

- Luria-Bertani- (LB) Medium; LB-Agar

NaCl	10g
Bacto-Trypton	10g
Hefeextrakt	5g
mit H ₂ O _{demin}	ad 1000ml

Mit NaOH auf pH 7,5 einstellen und anschließend autoklavieren.

Zur Herstellung von LB-Agar 15g Bacto-Agar ad 1000ml LB hinzufügen.

- Antibiotika-Lösungen

Antibiotikum	Stammlösung	Gebrauchslösung
Ampicillin (Amp)	100mg/ml	100 μ g/ml (in <i>Aqua bidest</i>)
Chloramphenicol (Cam)	34mg/ml	17 μ g/ml (in EtOH (100 %))
Kanamycin (Kan)	10mg/ml	25 μ g/ml (in <i>Aqua bidest</i>)

Lösungen steril filtrieren und bei -20°C lagern.
 Die Zugabe erfolgte immer nach dem Autoklavieren des Mediums.

Durchführung:

Zur Herstellung von Flüssigkulturen wurde immer nur von einer einzelnen Kolonie einer frischen Plattenkultur ausgegangen. Das Picken der Kolonie erfolgte mit einer sterilen Pipettenspitze, die dann in ein mit Medium gefülltes Reagenzglas (5ml LB-Medium für *high-copy* Plasmide bzw. 10ml LB-Medium bei *low copy* Plasmiden z.B. BAC-Plasmid, *shuttle*-Plasmid), evtl. mit entsprechendem Antibiotikum versetzt, überführt wurde. Die Anzucht erfolgte üN bei geeigneter Temperatur unter Schütteln (250U/min). Für größere Kulturvolumina (\geq 10ml) wurde zuerst eine 5ml Vorkultur angeimpft und aus dieser nach 5h bis 8h Inkubation ein größeres Volumen im Verhältnis 1:1000 angeimpft.

2.4.2.2 Plattenkulturen

Plattenkulturen sind sowohl dazu geeignet, Bakterien über einen begrenzten Zeitraum von maximal zwei Wochen zu lagern, als auch dazu, Transformanten zu selektionieren oder Flüssigkulturen anzupflanzen.

Durchführung:

Der LB-Agar (s. 2.4.2.1) wurde durch Aufkochen verflüssigt, auf 40°C bis 45°C abgekühlt, mit den entsprechenden Antibiotika versetzt und anschließend in sterile Einweg-Plastikschalen gegossen. Nach der Polymerisierung konnten die Platten für mehrere Wochen im Kühlschrank gelagert werden. Die Plattenkulturen wurden je nach Anwendung mittels Verdünnungsausstrich oder flächig mit einem Drigalski-Spatel angelegt.

2.4.2.3 Dauerkulturen

Zur dauerhaften Lagerung von Bakterienklonen wurden Dauerkulturen angelegt. Dazu wurden 500µl einer frischen LB-Kultur in Einfrierröhrchen überführt, mit 600µl 86%-igem Glycerin gemischt und anschließend bei -70°C gelagert.

2.4.3 Transformation kompetenter Bakterienzellen

2.4.3.1 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Verwendete Materialien:

- Glycerinlösung 10% (v/v)

Glycerin (86%)	10%
<i>Aqua bidest</i>	ad 2l

Lösung bei 4°C vorkühlen.

Durchführung:

Von einer frischen Plattenkultur wurde eine Kolonie gepickt und in 10ml LB-Medium (eventuell mit benötigtem Antibiotikum (s. 2.4.2.1)) üN bei 37°C schüttelnd inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden 500ml LB-Medium (mit benötigtem Antibiotikum) mit einem Volumen 1:100 mit der Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert, bis sich eine optische Dichte bei 600nm (OD_{600}) von 0,5 bis 0,7 eingestellt hatte. Anschließend wurden die Bakterien sofort auf Eis gekühlt und danach bei $4000\times g$ (Sorvall RC5 Plus, Rotor: SLA 3000) und 4°C für 15min zentrifugiert. Alle nachfolgenden Schritte wurden nun auf Eis und

mit vorgekühlter 10%-iger Glycerinlösung (v/v) durchgeführt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und das Pellet in 500ml Glycerinlösung aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation und Abnehmen des Überstandes wurden die Pellets in dem halben Kulturvolumen (250ml) Glycerinlösung aufgenommen. In einem letzten Waschschrift wurde das Pellet in 100ml Glycerinlösung aufgenommen und zentrifugiert. Das so erhaltene Zellpellet wurde in 1ml bis 2ml Glycerinlösung aufgenommen, in Aliquots à 50µl in Reaktionsgefäße überführt und diese sofort in flüssigem Stickstoff weggefroren oder direkt für die Elektrotransformation verwendet (s. 2.4.3.2). Aufbewahrt wurden die Zellen bei -70°C.

2.4.3.2 Elektrotransformation

Durchführung:

Ein Aliquot elektrokompenter Bakterien (s. 2.4.3.1) wurde auf Eis aufgetaut und mit der zu transformierenden DNA auf Eis gemischt. Dabei wurden maximal 2µl Ligationsansatz (s. 2.4.12) bzw. 1ng bis 5ng Plasmid-DNA verwendet. Der Ansatz wurde in die vorgekühlte Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 2mm) überführt und die Bakterien bei 2,5kV, 400Ω und 25µF perforiert (Gene Pulser, BIORAD, München). Im Anschluss daran wurde der Ansatz unmittelbar in 1ml LB-Medium aufgenommen und für 30min bis 90min bei entsprechender Temperatur unter Schütteln inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Ansatz auf einer LB-Agarplatte mit Antibiotikum ausgestrichen.

2.4.3.3 Elektrotransformation von BAC-Plasmiden

Durchführung:

Für die Transformation von BAC-Plasmiden wurde ein Protokoll von Swaminathan und Sharan (2004) modifiziert angewendet. Dabei ist zu beachten, dass sowohl die BAC-DNA (s. 2.4.4.5) als auch die elektrokompenten Bakterien (s. 2.4.3.1) möglichst am Tag der Elektrotransformation präpariert wurden. Für die Transformation wurden zwischen 1µl bis 3µl BAC-DNA mit 50µl Bakterien in einem Reaktionsgefäß vorsichtig gemischt, in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 1mm) überführt und für 1min bis 3min auf Eis inkubiert. Die Elektrotransformation erfolgte dann bei 1,75kV, 200Ω und 25µF (*Gene Pulser*, BIORAD, München). Die Bakterien wurden sofort in 1ml LB-Medium aufgenommen, für 60min bei entsprechender Temperatur unter Schütteln inkubiert und auf einer LB-Agarplatte mit Cam ausplattiert.

2.4.4 Isolierung von DNA

Zur Schnellpräparation von Plasmid-DNA wird meist die Methode der alkalischen Lyse (Birnboim and Doly, 1979; Birnboim, 1983) verwendet. Dazu wurden die Bakterien mit einem Puffer behandelt, der SDS und NaOH enthält, um sie zu lysieren. Das enthaltene SDS denaturiert Proteine. Chromosomale DNA, sowie Plasmid-DNA werden durch NaOH denaturiert. Durch die Zugabe von KAc wird das Gemisch neutralisiert, die Plasmid-DNA renaturiert, wohingegen der größte Teil der chromosomalen DNA, der Proteine und das SDS durch Zentrifugation präzipitiert wird. Die Plasmid-DNA befindet sich nach der Zentrifugation im Überstand und wird durch Alkohol-Fällung präzipitiert.

Um hoch reine Plasmid-DNA z.B. zur Sequenzierung oder Transformation zu erhalten, wird diese über eine QIAprep *spin*-Säule (QIAGEN, Hilden) isoliert. Zugrunde liegt auch hier das Prinzip der oben beschriebenen alkalischen Lyse. Durch die wechselnden Bedingungen während der einzelnen Arbeitsschritte werden Proteine, Zelltrümmer und chromosomale DNA von der Plasmid-DNA getrennt, die reversibel an die Silika-Membran der Säule bindet und zum Schluss von der Säule eluiert werden kann.

2.4.4.1 Schnellpräparation von Plasmid-DNA

Verwendete Materialien:

- Puffer 1 (P1)

Tris	50mM
Na ₂ EDTA×2H ₂ O	10mM
mit <i>Aqua bidest</i>	ad 1000ml

Mit HCl auf pH 8,0 einstellen.
Autoklavieren und danach 100mg RNase dazugeben.
- Puffer 2 (P2)

NaOH	200mM
SDS (20% v/v)	1%
mit <i>Aqua bidest</i>	ad 100ml

Lösung autoklavieren und bei RT lagern.
- Puffer 3 (P3)

KAc	3M
mit <i>Aqua bidest</i>	ad 1000ml

Mit Eisessig auf pH 5,5 einstellen, autoklavieren.
Lösung bei 4°C lagern.
- 1× TE oder 10mM Tris/HCl (pH 8)

Durchführung:

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien wurden 5ml LB-Medium (mit entsprechendem Antibiotikum) direkt mit einer Bakterienkolonie beimpft und üN bei entsprechender Temperatur inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 2ml der Übernachtskultur in ein Reaktionsgefäß überführt und die Bakterien bei $20.000 \times g$ (Eppendorf 5417R, Rotor: F45-30-11) für 1min bei RT pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 100 μ l P1 resuspendiert. Nach der Zugabe von 200 μ l P2 wurde das Gemisch 5min bei RT inkubiert und nach der Zugabe von 150 μ l P3 für 10min auf Eis inkubiert. Danach wurde für 30min bei $20.000 \times g$ (Eppendorf centrifuge 5417R, Rotor: F45-30-11) und 4°C zentrifugiert, der Überstand mit 400 μ l Isopropanol versetzt und ein zweites Mal für 10min bei 4°C und $20.000 \times g$ zentrifugiert. Nach dem Trocknen der DNA wurde diese in 50 μ l TE oder 10mM Tris/HCl pH 8,0 gelöst.

2.4.4.2 Schnellpräparation von BAC-Plasmid-DNA

Die Schnellpräparation von BAC-Plasmiden beruht auf dem Prinzip der in Kapitel 2.4.4.1 beschriebenen Methode der alkalischen Lyse von Bakterien. Da es sich jedoch bei BAC-Plasmiden um besonders große *low copy* Plasmide handelt, müssen einige Modifikationen beachtet werden. Durch ihre Größe von ca. 240kbp müssen zur Erhaltung ihrer Integrität Scherkräfte vermieden werden. Dies bedeutet u.a. ein Verzicht auf Vortexen und die Verwendung von abgeschnittenen Pipettenspitzen.

Durchführung:

In einem Reagenzglas wurden 10ml LB-Medium mit Cam mit einer Einzelkolonie angeimpft und üN bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach Anlage einer Übernachtskultur wurden die Bakterien am nächsten Tag durch Zentrifugation mit $2380 \times g$ (Heraeus Labofuge 400R, Rotor: 8179) bei 4°C für 6min pelletiert. Das Bakterienpellet wurde in eiskalten 200 μ l P1 (s. 2.4.4.1) resuspendiert und in ein 2ml Reaktionsgefäß überführt. Zur alkalischen Lyse wurden 300 μ l P2 zugegeben, der Ansatz vorsichtig durch Invertieren gemischt und anschließend für 5min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 300 μ l eiskaltem P3 und Inkubation für 10min auf Eis fielen SDS, chromosomale DNA und Proteinbestandteile aus. Nach der Zentrifugation mit $20.000 \times g$ (Eppendorf 5417R, Rotor: F45-30-11) bei 4°C für 15min wurde der Überstand mit 600 μ l raumtemperiertem Isopropanol versetzt, suspendiert und erneut für 30min bei 4°C zentrifugiert und das entstandene DNA-Präzipitat in 100 μ l 10mM Tris/HCl pH 8,5 oder TE mit 1% RNase A aufgenommen. Zum besseren Lösen der DNA wurde das Pellet für 10min bei 37°C inkubiert. Die Lagerung der BAC-DNA erfolgte bei 4°C.

2.4.4.3 QIAprep Spin Miniprep

Um reine Plasmid-DNA z.B. für Sequenzierungen oder Transformationen zu erhalten, wurde diese über Säulen (QIAGEN, Hilden) aufgereinigt. Das Prinzip der QIAprep Miniprep beruht auf einer Kombination der alkalischen Lyse von Bakterien und anschließender reversibler Adsorption der DNA an eine Silicagel-Membran. Durch unterschiedliche Salzkonzentrationen während der einzelnen Arbeitsschritte erfolgt die Trennung der Plasmid-DNA von der genomischen DNA, Proteinen und Bakterienbruchstücken, sowie die Elution der Plasmid-DNA.

Nach Angaben des Herstellers wurden hierzu 5ml LB-Medium mit der entsprechenden Kultur beimpft und üN inkubiert. Die QIAprep Spin Minipreps wurden mit 1,5ml der Bakteriensuspension durchgeführt. Nach mehrmaligem Waschen wurde die DNA mit 50µl Elutionspuffer (10mM Tris/HCl pH 8,5) oder *Aqua bidest* durch 1min Zentrifugation bei 20.000×g (Eppendorf 5417R, Rotor: F45-30-11) von der *spin*-Säule eluiert.

Das ausführliche Firmenprotokoll ist unter <http://www1.qiagen.com/products/plasmid/qiagenplasmidpurificationsystem/qiagenplasmidminikit.aspx> bereitgestellt.

2.4.4.4 QIAGEN Plasmid-Maxipräparation

Zur Aufreinigung größerer Plasmid-Mengen wurde das QIAGEN Plasmid Maxi Kit (QIAGEN, Hilden) verwendet. Das Protokoll der Plasmid-Aufreinigung beruht auf einer modifizierten alkalischen Lyse der Bakterienzellen. Dabei bindet die Plasmid-DNA unter geeigneten Niedrigsalz- und pH-Bedingungen an eine Anionenaustauscher-Säule. Zelluläre Bestandteile wie RNA, Proteine und niedermolekulare Verunreinigungen werden bei mittlerer Salzkonzentration von der Säule gewaschen. Die gereinigte Plasmid-DNA wird bei hoher Salzkonzentration von der Säule eluiert und zur Entsalzung mit Isopropanol gefällt.

Ausgehend von einer 5ml-Übertagkultur wurden die Übernachtskulturen in 200ml für *high-copy*-Plasmide bzw. 500ml für *low copy*-Plasmide 1:1000 in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum beimpft und weiter unter Schütteln bei geeigneter Temperatur üN inkubiert. Die Zellen wurden am nächsten Tag bei 4°C für 10min und 5468×g (Sorvall RC5C Plus, Rotor: SLA 1500) pelletiert und anschließend wie im Firmenprotokoll beschrieben bearbeitet. Die Plasmid-DNA wurde in einem geeigneten Volumen TE pH 8,0 oder 10mM Tris/HCl pH 8,5 aufgenommen und kann bei -20°C gelagert werden.

Nähere Angaben sind dem Firmenprotokoll unter <http://www1.qiagen.com/products/plasmid/qiagenplasmidpurificationsystem/qiafilterplasmidmaxikit.aspx> zu entnehmen.

2.4.4.5 BAC-Plasmid-Maxipräparation

Um große Mengen hochreiner BAC-Plasmid-DNA aufzureinigen, wurde das Nucleobond Kit PC 500 (Macherey und Nagel, Düren) verwendet. Dazu wurden 500ml LB-Medium mit Cam 1:500 mit einer frischen Bakterien-Vorkultur angeimpft und üN bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation bei 3797×g (Sorvall RC5C Plus, Rotor: SLA-1500) und 4°C für 10min pelletiert. Die DNA wurde wie im Firmenprotokoll beschrieben isoliert und in 250µl TE pH 8,0 oder 10mM Tris/HCl pH 8,5 mit 1% RNase A üN gelöst. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

Ausführliche Angaben sind im Firmenprotokoll unter http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/Plasmid%20DNA%20Purification/UM_pDNA_NuBo.pdf zu finden.

2.4.4.6 DNA-Isolierung aus Organen, Zellen und Geweben

Zur Gewinnung von DNA aus Zellen wurde standardmäßig das DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Hilden) verwendet. Dieses Kit ermöglicht eine schnelle und saubere Isolierung von DNA aus Organen, Zellen und Geweben. Die Zellen werden hierbei lysiert und die freigesetzte DNA reversibel an eine Silicagel-Matrix gebunden. Die DNA wird auf der Säule durch Waschen gereinigt und anschließend eluiert.

Eingesetzte Gewebe oder Organe wurden mit Hilfe der Labor-Schwingmühle MM 300 (Mixer-Mill) von QIAGEN (Hilden/Retsch) homogenisiert. Dazu wurden in ein 2ml-Reaktionsgefäß ein bis zwei Stahlkugeln (Ø 3mm) und bis zu 300mg Gewebe gegeben. Die Organstücke wurden bei 30Hz für 2×2min zerkleinert. Danach wurde der ATL-Lysepuffer und die Proteinase K dazugegeben und der Ansatz bei 56°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde ein Aliquot des Homogenats wie im Firmenprotokoll beschrieben zur DNA-Isolierung eingesetzt. Es musste darauf geachtet werden, dass die für die Säule maximal einzusetzende Gewebemenge nicht überschritten wird, da dies zu deren Überladung und so zu Verlusten in der DNA-Ausbeute führt. Am Ende wurde die DNA in einer definierten Menge mit AE-Elutionspuffer eluiert. Bei geringeren Mengen an Ausgangsmaterial konnte die Elutionsmenge auf bis zu 50µl reduziert werden.

Das ausführliche Firmenprotokoll ist unter <http://www1.qiagen.com/literature/protocols/DNeasyBloodTissue.aspx> nachzulesen.

2.4.4.7 Isolierung viraler und zellulärer Nucleinsäuren aus Virusüberständen

Virale und zelluläre DNA aus Virusüberständen wurde mit dem High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche, Mannheim) isoliert. Bevor der Virusüberstand mit dem Bindepuffer vermischt wurde, mussten 3,2µl polyA-RNA und 50µl Proteinase K zum Bindepuffer hinzugegeben werden. Erst jetzt wurden 200µl Virusüberstand mit 250µl des Bindepuffers gemischt und für 10min bei 72°C inkubiert. Anschließend wurden weitere 100µl Bindepuffer (ohne polyA-RNA und Proteinase K) hinzugefügt und das gesamte Gemisch auf die Säule gegeben und die DNA daran gebunden. Nach dem Waschen und Trocknen der Säule wurde die virale DNA in 50µl Elutionspuffer bzw. *Aqua bidest* eluiert.

Das ausführliche Firmenprotokoll ist unter http://www.roche-applied-science.com/PROD_INF/MANUALS/napi_man/pdf/chapter2/page_69-73.pdf zu finden.

2.4.4.8 Präzipitation von Nucleinsäuren

Verwendete Materialien:

- Natriumacetat-Puffer
NaAc×3H₂O 3M
mit *Aqua bidest* ad 100ml
Lösung mit Eisessig auf pH 5,2 einstellen und autoklavieren.
- Tris-Puffer (Tris/HCl)
Tris 10mM
mit *Aqua bidest* ad 1000ml
Lösung mit HCl auf pH 8,0 einstellen und autoklavieren.

Durchführung:

Nucleinsäuren können aus wässrigen Lösungen durch Zugabe von monovalenten Kationen und Alkohol gefällt werden (Eickbush and Moudrianakis, 1978). Als Fällungsreagenzien wurden dabei $\frac{1}{10}$ Volumen 3M NaAc-Puffer pH 5,2 und die 2,5-fache Menge eiskaltes Ethanol (100% (v/v)) verwendet. Die Volumenangaben beziehen sich auf das Volumen der zu fällenden Nucleinsäurelösung. Die Fällung erfolgte üN bei -20°C. Nach dem Fällern der Nucleinsäuren wurden die Proben für 30min bei 0°C mit 20.000×g (Eppendorf centrifuge 5417R, Rotor: F45-30-11) pelletiert. Nachdem das Präzipitat mit dem gleichen Volumen kaltem Ethanol (70% (v/v)) gewaschen wurde, um eventuell vorhandene Salze zu entfernen, wurde ein weiteres Mal für 15min bei höchster Geschwindigkeit zentrifugiert und der Überstand mit einer Pipette entfernt. Das

DNA-Pellet wurde anschließend für 15min bei RT getrocknet und die DNA in einem geeigneten Volumen 10mM Tris/HCl pH 8,0 gelöst. Bei sehr geringen DNA-Mengen ist das DNA-Pellet nicht oder kaum sichtbar, weshalb beim Absaugen des Überstandes und Lösen der DNA genau auf die Position des Reaktionsgefäßes während der Zentrifugation geachtet werden muss.

2.4.5 Isolierung von RNA

Zur Isolierung von RNA wurde das RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden) verwendet. Das Prinzip des Kits beruht auf der Bindung von RNA (größer als 200bp) an eine Silicagel-Matrix unter Hochsalzbedingungen. RNA wird aus den Proben in Anwesenheit eines stark denaturierenden Guanidin-Isothiocyanat-Puffers (GITC), der vorhandene RNasen inaktiviert, isoliert, danach reversibel an eine Silicagel-Säule gebunden, gewaschen und eluiert.

2.4.5.1 RNA-Isolierung aus Organen

Die Isolierung von RNA aus Organen erfolgte in einer definierten Menge GITC-haltigen Puffers, der mit β -Mercaptoethanol versetzt war. Die Gewebestücke wurden in diesem Puffer aufgenommen und in der Labor-Schwingmühle MM 300 (QIAGEN, Hilden/Retsch) für 3min bei 30Hz homogenisiert (s. 2.4.4.6). Anschließend wurde das Homogenat bei maximaler Geschwindigkeit für 3min zentrifugiert und mit dem Überstand weitergearbeitet. Dieser wurde mit 70% Ethanol (v/v) versetzt und auf eine RNeasy-Säule (QIAGEN, Hilden) gegeben. Nach den folgenden zwei Waschschritten mit unterschiedlichen Waschpuffern wurde die RNA im Anschluss in 30 μ l bis 50 μ l RNase-freiem Wasser eluiert.

Zusätzlich wurde während der Aufreinigung ein DNase-Verdau durchgeführt. Hierzu wurde nur mit der Hälfte des ersten Waschpuffers gewaschen und 10 μ l DNase I (QIAGEN, Hilden) mit 70 μ l Waschpuffer versetzt und auf die Säule gegeben. Nach 15min Inkubation bei RT wurde mit der zweiten Hälfte des ersten Waschpuffers gewaschen und das Protokoll wie oben beschrieben weitergeführt.

Ausführlichere Angaben sind dem Firmenprotokoll unter <http://www1.qiagen.com/literature/protocols/RNeasyMini.aspx> zu entnehmen.

2.4.5.2 RNA-Isolierung aus Zellen

Zur Isolierung von RNA aus Zellkulturen wurden die Zellen direkt in der Zellkulturschale mit GITC-haltigem Puffer versetzt, auf eine QIAshredder-Säule (QIAGEN, Hilden) gegeben und bei maximaler Geschwindigkeit für 2min zentrifugiert. Der DNase-Verdau, die Waschschrirte und die Elution erfolgten wie unter 2.4.5.1 beschrieben.

Das ausführliche Protokoll ist unter <http://www1.qiagen.com/literature/protocols/RNeasyMini.aspx> zu finden.

2.4.6 Quantifizierung von Nukleinsäure-Proben

Die Bestimmung der Konzentration von DNA-Lösungen erfolgte standardgemäß spektrometrisch durch Messung der Extinktion (Ex) bei 260nm im Photometer (BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg) oder Nanodrop (PeqLab, Erlangen)). Die minimal messbaren Volumina betragen 50µl (BioPhotometer) bzw. 1µl Lösung (Nanodrop). Bei hohen DNA-Konzentrationen wurden die Lösungen in TE oder 10mM Tris/HCl pH 8,0 verdünnt. Diese gepufferten Systeme sind Wasser vorzuziehen, da das Absorptionsverhalten von Nukleinsäuren in nicht gepufferten Lösungen stark variieren kann (Wilfinger *et al.*, 1997). Der Konzentrationsberechnung wurde folgender Wert zugrunde gelegt:

$$E_{260\text{nm}} = 1 \text{ entspricht } 50\mu\text{g/ml bei dsDNA}$$

Die Reinheit einer DNA-Probe durch Proteinverunreinigungen lässt sich über den Extinktionsquotienten E_{260}/E_{280} bestimmen. Der Quotient gibt dabei das Verhältnis zwischen Nukleinsäure und Protein an. Proteinfreie DNA-Lösungen weisen ein Verhältnis von 1,8 bis 2,0 auf, für RNA sollte der Quotient über 2,0 liegen (Sambrook and Russel, 2001).

2.4.7 Restriktion

Für analytische Zwecke wurden meist 200ng bis 1500ng Plasmid-DNA in 10µl bis 20µl-Ansätzen mit Restriktionsenzymen geschnitten. Standardmäßig wurden hierfür Enzymmengen von 5U bis 20U pro Ansatz in einem für die Aktivität des Enzyms geeigneten Puffer eingesetzt. Der Restriktionsenzymverdau erfolgte bei Enzym-spezifischer Temperatur für 6h bis üN. Sofern die Pufferbedingungen übereinstimmten, konnten mehrere Restriktionsenzyme in einem Ansatz verwendet werden. Präparative DNA-Restriktionen, bei denen größere Mengen an DNA (5µg bis 20µg) verdaut wurden, erfolgten immer üN.

Tab. 2.18: Standard-Restriktionsansatz

Reagenz	Menge
Plasmid-DNA	x μ l
10x Restriktionspuffer	2 μ l
Restriktionsenzym	y μ l
<i>Aqua bidest</i>	ad 20 μ l

Zur molekularen Analyse von BAC-Plasmiden durch Restriktionsenzymverdau wurden generell 12 μ l der Maxi-Prep (s. 2.4.4.5) üN mit 20U des Enzyms in einem Gesamtvolumen von 60 μ l verdaut.

Nach der Restriktion erfolgte immer eine Aufreinigung der DNA über ein präparatives Agarosegel und anschließender Gelelektion oder über eine Säule (s. 2.4.9).

2.4.8 Native Gelelektrophorese von DNA

DNA-Fragmente können in Agarosegelen nach ihren Molekulargewichten elektrophoretisch aufgetrennt werden. Mit Hilfe der nativen Gelelektrophorese wurden Größenabschätzungen von DNA-Fragmenten, Reinigung von linearen DNA-Fragmenten, Intaktheits-Überprüfungen und präparative Auftrennungen von Nukleinsäuren durchgeführt.

Verwendete Materialien:

- 50 \times TAE-Puffer

Tris	450mM
EDTA \times 2H ₂ O	10mM
mit H ₂ O _{demin}	ad 5l

Lösung mit Eisessig auf pH 8,0 einstellen und anschließend autoklavieren.
Gebrauchslösung: 1 \times TAE
- 50 \times TBE-Puffer

Tris	400mM
EDTA \times 2H ₂ O	50mM
Borsäure	450mM
mit H ₂ O _{demin}	ad 1000ml

Lösung mit Eisessig auf pH 8,3 einstellen und anschließend autoklavieren.
Gebrauchslösung: 1 \times TBE
- 10x Probenpuffer

Saccharose	67%
Bromphenolblau	0,05%

Durchführung:

Standardmäßig erfolgte die Auftrennung der DNA in 1%-igen Agarosegelen mit TAE-Puffer. Für die Auftrennung von restringierten BAC-Plasmiden mit Fragmentgrößen zwischen 1kbp bis 30kbp wurden 0,7%-ige Agarosegele in TBE-Puffer verwendet. In der Regel kamen sogenannte Maxi-Gele (20×20cm bzw. 20×10cm) oder Mini-Gele (10×6,5cm) zum Einsatz. Die Mini-Gele wurden in erster Linie zur schnellen Kontrolle der DNA nach Restriktionen oder PCRs eingesetzt. Vor dem Gel-Lauf wurden die Proben mit $\frac{1}{10}$ Volumen Probenpuffer versetzt, um das Einsinken der Nukleinsäuren in die Geltaschen zu ermöglichen. Die anschließende Trennung der Fragmente nach ihrer molekularen Größe erfolgte in horizontalen Elektrophoresekammern in 1× TAE. Die angelegte Spannung (0,5V/cm bis 5V/cm Elektrodenabstand) richtet sich nach Fragment- bzw. Gelgröße. Die Auftrennung linearisierter BAC-DNA erfolgte in speziellen Maxi-Gelen (20×25cm) bei 4°C (Gel-Herstellung: und Schimpf, 1999) mit 1× TBE (höhere Pufferkapazität im Vergleich zu TAE) als Laufpuffer. Um die DNA Banden zuordnen zu können, wurde gleichzeitig mit den Proben ein DNA-Längenstandard (invitrogen, Karlstuhe) mitgeführt und dem Gel Ethidiumbromid (Endkonzentration: 1µg/ml) hinzugefügt, um die Banden sichtbar zu machen. Ethidiumbromid ist ein DNA-interkalierendes Fluorophor, das, mit UV-Licht angeregt, die DNA sichtbar macht. Die Dokumentation erfolgte entweder mit Hilfe einer Sofortbild-Kamera (Polaroid Land Camera MP-4 mit Polaroidfilm Typ 667, UV-Filtersystem KodakWratten 2A) oder einer CCD-Kamera.

2.4.9 Elution von DNA aus Agarosegelen

Das QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden) ist geeignet, um DNA von 70bp bis 10kbp aus Agarosegelen zu extrahieren und zu reinigen. Die Säule kann maximal mit 400mg Agarose beladen werden, um die Ladekapazität nicht zu überschreiten, was zu einer verminderten DNA-Ausbeute führen kann.

Durchführung:

Die zu reinigende DNA wurde auf ein Agarosegel aufgetragen und nach der Elektrophorese das spezifische DNA-Fragment aus dem Gel herausgeschnitten und in einem Reaktionsgefäß gewogen. Anschließend wurden 3 Volumen QG-Puffer auf 1 Volumen Agarosegel pipettiert, wobei 100mg Agarose 100µl QG-Puffer entsprechen. Die Agarose wurde für ca. 10min bei 50°C inkubiert, bis sich diese vollständig aufgelöst hatte. Anschließend wurde ein Gel-Volumen Isopropanol hinzugegeben und die DNA durch Zentrifugation an die Säule gebunden. Nach den verschiedenen Waschschrritten wurde die Säule getrocknet und die DNA mit 50µl Elutionspuffer von der Säule eluiert.

Ausführliche Angaben sind dem Firmenprotokoll unter <http://www1.qiagen.com/products/dnacleanup/gelpcrsicleanupsystems/qiaquickgelextractionkit.aspx> zu entnehmen.

2.4.10 Aufreinigung von PCR-Produkten

Zur schnellen Aufreinigung von DNA, z.B. nach einer Polymerase Kettenreaktion (PCR), wurde das High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Mannheim) verwendet. In Anwesenheit von Guanidin Thiocyanat bindet die amplifizierte DNA selektiv an spezifische Glasfasern. Die gebundene DNA wird durch verschiedene Waschschriffe von Kontaminationen wie z.B. *Primern*, Nukleotiden und Salzen gereinigt und unter Niedrigsalz-Bedingungen von der Säule eluiert.

Durchführung:

Die DNA wurde zuerst mit *Aqua bidest* zu 100µl aufgefüllt und mit 500µl Bindepuffer versetzt und gemischt. Nach der Zentrifugation für 1min bei 13.000×g (Eppendorf centrifuge 5417R, Rotor: F45-30-11) wurde die Säule zweimal mit 500µl bzw. 200µl Waschpuffer gewaschen und wie zuvor zentrifugiert. Die Elution erfolgte mit 50µl bis 100µl Elutionspuffer oder *Aqua bidest* und anschließender Zentrifugation.

Nähere Angaben sind im Firmenprotokoll unter https://www.roche-applied-science.com/PROD_INF/MANUALS/napi_man/napi.htm nachzulesen.

2.4.11 Dephosphorylierung linearer DNA

Nach einem Restriktionsenzymverdau können Vektoren, die mit einem Restriktionsenzym geschnitten wurden, das nur eine Schnittstelle im Vektor besitzt, durch ihre kompatiblen Enden wieder miteinander religieren. Diese Religation des Vektors würde bei einer Klonierung zu einem hohen Hintergrund führen. Um eine Religation zu verhindern, dephosphoryliert man die terminalen Phosphatgruppen am 5'-Ende des linearisierten Vektors mittels alkalischer Phosphatase. Hierzu wurde die Calf Intestinal Phosphatase (CIP) (NEB, Schwalbach) verwendet. Pro 1µg DNA wurden 0,5U des Enzyms benötigt, die direkt in den Restriktionsansatz hinzugegeben und für 1h bei 37°C inkubiert wurden, da CIP in den meisten Puffern von NEB aktiv ist. Wurden Restriktionsenzyme mit Puffern anderer Hersteller verwendet, mussten die Restriktionsansätze zuvor wie unter 2.4.10 beschrieben gereinigt werden.

Tab. 2.19: Standard-Dephosphorylierungsansatz

Reagenz	Menge
Plasmid-DNA	x μ l
CIP	1 μ l
10 \times CIP-Puffer	12 μ l
<i>Aqua bidest</i>	ad 120 μ l

Zur vollständigen Entfernung der alkalischen Phosphatase musste der gesamte Ansatz über ein präparatives Agarosegel gereinigt und die DNA anschließend aus dem Gel eluiert werden (s. 2.4.9).

2.4.12 Ligation von DNA-Fragmenten

Um zwei dsDNA-Fragmente, die zuvor mit Restriktionsenzymen geschnitten wurden (glatte Enden oder überhängende Enden), zu verbinden, kann mit Hilfe der T4 DNA-Ligase unter ATP-Verbrauch eine Phosphodiesterbindung zwischen einer 5'-Phosphatgruppe und einer 3'-Hydroxylgruppe der dsDNA ausgebildet werden. Für die Ligation zweier DNA-Fragmente wurde jeweils zwischen 0,5pmol und 1pmol des linearisierten, dephosphorylierten Vektors (ca. 50ng bis 400ng) und 1pmol des geschnittenen Inserts verwendet. Die benötigten DNA-Mengen konnten mit folgender Formel berechnet werden:

$$X \mu\text{g}_{\text{dsDNA}} = \frac{1}{1 \times 10^6} \times y \text{ pmol} \times N_{\text{bp}} \times 660 \mu\text{g mol}^{-1}$$

y: pmol dsDNA; N: Anzahl an Basenpaaren

Für die Ligation zweier kohäsiver Enden wurden 1U bis 2U verwendet, für glatte Enden 5U der T4 DNA-Ligase. Bei der Ligation von glatten Enden wurde zusätzlich noch $\frac{1}{10}$ Volumen Polyethylen Glycol-Lösung (PEG) eingesetzt. Die Ligation erfolgte entweder für 2h bei 22°C oder bei 16°C üN.

Tab. 2.20: Standard-Ligationsansatz

Material	Menge
Insert (1pmol)	x μ l
Vektor (0,5pmol bis 1pmol)	y μ l
10 \times Ligationspuffer	1,5 μ l
PEG	1,5 μ l
T4 DNA-Ligase (1U/ μ l)	z μ l
<i>Aqua bidest</i>	ad 15 μ l

Je 1 μ l des Ligationsansatzes wurde in die Transformation (s. 2.4.3.2) von *E. coli* DH10B eingesetzt.

2.4.13 Die PCR

Die PCR stellt eine sehr empfindliche Methode zur Amplifizierung von spezifischen DNA-Abschnitten dar (Saiki *et al.*, 1988). Die Methode basiert auf den grundlegenden Abläufen der DNA-Replikation. Dabei benötigt man Sequenz-spezifische Oligonukleotide (*Primer*), die den zu amplifizierenden Bereich festlegen. Somit können bestimmte Sequenzbereiche selektiv amplifiziert werden. Als Polymerase dient ein Enzym aus thermophilen Bakterien, z.B. die *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus*. Dieses thermostabile Enzym ermöglicht es, das DNA-Molekül (*Template*) thermisch mit Hitze zu denaturieren (Denaturierungsphase), da es selbst intakt bleibt. An die nun einzelsträngig vorliegende DNA können die *Primer* durch Erniedrigung der Temperatur (je nach *Primer*-Sequenz) an ihre homologen Sequenzen binden (*annealing*-Phase). Anschließend findet eine Neusynthese von DNA, ausgehend von den *Primern* durch die thermostabile DNA-Polymerase, statt (*extension*-Phase). Durch ständige Wiederholung dieser Schritte wird das gewünschte DNA-Fragment (Amplifikat) in sehr großer Menge hergestellt. Da sich die Zahl der neu entstandenen Moleküle mit jedem Zyklus verdoppelt, können theoretisch bei n Amplifikationen 2^n Moleküle entstehen. Begrenzender Faktor in dieser Reaktion ist, vorausgesetzt *Primer* und Nukleotide liegen im Überschuss vor, die Aktivitätsdauer der Polymerase. Die Auswahl der Sequenz-spezifischen *Primer* erfolgte mit Hilfe des Programms Clone Manager Suite 7 und *Primer Express* 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Bei der Erstellung der *Primer* musste darauf geachtet werden, dass keine internkomplementären Sequenzen verwendet wurden, welche zu Sekundärstrukturen innerhalb der Oligonukleotide führen können. Um eine ausreichende Sequenz-Spezifität und bestmögliche Hybridisierungen des DNA-DNA-Duplexes zu gewährleisten, wurden *Primer* mit einer Länge von mindestens 19 Nukleotiden und einem Cytosin oder Guanotin am 3'-Ende ausgewählt.

Tab. 2.21: Standard *Taq* oder HotStar *Taq* PCR-Ansatz

Komponente	Volumen/ Reaktion	Endkonzentration
10× PCR Puffer; 15mM MgCl ₂	5µl	1×; 1,5mM MgSO ₄
<i>Primer</i> _for (10pmol/µl)	1,5µl	0,3µM
<i>Primer</i> _rev (10pmol/µl)	1,5µl	0,3µM
dNTPs [je 10mM]	1µl	200µM je dNTP
<i>Taq</i> /HotStar <i>Taq</i> DNA-Polymerase	0,25 µl	1,25Units
<i>Template</i> -DNA	xµl	≤1µg pro Reaktion
<i>Aqua bidest</i>	ad 50µl	–

Tab. 2.22: Standard HotStar *Taq* PCR-Profil

	Zeit	Temperatur	
Initialer Aktivierungsschritt	15min	95°C	Aktivierung der HotStar <i>Taq</i> DNA-Polymerase
Denaturierung	1min	94°C	
<i>Annealing</i>	1min	50-68°C	je nach <i>Primer</i> -Sequenz
Extension	1min/1kbp	72°C	
Zyklenzahl	30-35		
abschließende Extension	10min	72°C	
Ende	∞	4°C	

Für PCRs unter Verwendung der *Taq* DNA-Polymerase wurde statt eines initialen Aktivierungsschritts ein initialer Denaturierungsschritt von 3min durchgeführt.

Für Klonierungszwecke, z.B. zum Einbringen von Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen, wurde ebenfalls die PCR verwendet. Das PCR-Produkt enthält spezifische Restriktionsschnittstellen und kann mit den entsprechenden Enzymen geschnitten und in einen Vektor ligiert werden. Die *Primer* wurden so konzipiert, dass die Restriktionsschnittstellen nicht direkt am 5'-Ende lagen, sondern *upstream* ein Überhang von drei „nonsense“ Basen eingebaut wurde, damit auch am Ende eines DNA-Strangs effektiv geschnitten werden konnte (Zimmermann *et al.*, 1998). Um eine möglichst geringe Fehlerrate während der PCR zu erhalten, wurde die ProofStart DNA-Polymerase (QIAGEN, Hilden) verwendet. Bei dieser Polymerase handelt es

sich um eine rekombinante DNA-Polymerase aus einem *Pyrococcus spec.*-Stamm. Sie besitzt eine 3' → 5'-Exonuklease Aktivität, die es erlaubt, falsch eingebaute Nukleotide vom 3'-Ende des wachsenden DNA-Strangs zu korrigieren.

Tab. 2.23: Standard *ProofStart* PCR-Ansatz

Komponente	Volumen/ Reaktion	Endkonzentration
10× <i>ProofStart</i> PCR Puffer; 15mM MgSO ₄	5µl	1×; 1,5mM MgSO ₄
<i>Primer</i> _for (10pmol/µl)	5µl	1µM
<i>Primer</i> _rev (10pmol/µl)	5µl	1µM
dNTPs (je 10mM)	1,5µl	300µM
<i>ProofStart</i> DNA-Polymerase	1µl	2,5U
<i>Template</i> -DNA	xµl	100ng-1µg genomische DNA 1-50ng Plasmid-DNA
<i>Aqua bidest</i>	ad 50µl	–

Tab. 2.24: Standard *ProofStart* PCR-Profil

	Zeit	Temperatur	
Initialer Aktivierungsschritt	5min	95°C	Aktivierung der DNA-Polymerase
Denaturierung	1min	94°C	
<i>Annealing</i>	1min	50-68°C	je nach <i>Primer</i> -Sequenz
Extension	1min/1kbp	72°C	
Zyklenzahl	30-45		

2.4.14 qPCR

Die Methode der *real-time* PCR ermöglicht es, die Zunahme an PCR-Produkten mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen in Echtzeit im Reaktionsgefäß zu verfolgen. Bei einer qPCR wird die Detektion der PCR-Amplifikate in der exponentiellen Phase der PCR realisiert. Die Detektion kann entweder nicht Sequenz-spezifisch mit dsDNA-bindenden Fluorochromen (z.B. SYBR GreenI) oder Sequenz-spezifisch mit fluorogenen Sonden (z.B. *TaqMan*TM-Sonden) erfolgen. In der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion ist die Menge des *Templates* direkt proportional zu der gemessenen Fluoreszenz. Aufgrund dieser Proportionalität kann direkt eine Mengenbestimmung

der zu untersuchenden Probe durchgeführt werden. Die Auswahl der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Sequenz-spezifischen Oligonukleotide erfolgte mit Hilfe des Programms *Primer Express 2.0* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

2.4.14.1 Absolute Quantifizierung

Zur absoluten Quantifizierung von CMV-Genomen in Organen, Zellen oder im Blut wurde eine qPCR mit SYBR GreenI oder *TagMan*TM-Sonde in einem ABIPrism 7500 *real-time Cycler* durchgeführt. Es wurden gegen den speziellen ORF gerichtete Sonden verwendet und Sequenz-spezifische *Primer*, um die Zielsequenz mit der HotStar *Taq* DNA-Polymerase (QIAGEN, Hilden) zu amplifizieren.

Als Plasmid-Standard für die absolute Quantifizierung wurde das Plasmid pDrive-gB-PTHrP-BAC verwendet. Dazu wurde das Plasmid linearisiert, gereinigt und auf eine definierte Molekülmenge eingestellt:

$$\text{Molekülmenge (Plasmide}/\mu\text{l}) = \frac{6,022 \times 10^{23} \text{ (Kopien/mol)} \times \text{Plasmid-Konzentration (g}/\mu\text{l)}}{\text{MW (g/mol)}}$$

$$\text{MW für dsDNA: Plasmidgröße (bp)} \times 660 \text{ Dalton/bp}$$

Mit Hilfe einer Verdünnungsreihe dieses Plasmid-Standards (10 bis 1×10^7 Kopien), wurde bei jeder Messung eine Eichkurve erstellt, anhand derer die absolute Zahl an Genomen in der zu untersuchenden Probe bestimmt werden konnte. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Betriebssoftware des ABIPrism 7500 durch die halblogarithmische Auftragung der C_T -Werte (*threshold cycle*) gegen die entsprechende Kopienzahl des *Templates*, wobei der C_T -Wert einer Reaktion dem Zyklus der PCR entspricht, in dem die gemessene Probe einen festgelegten Fluoreszenzschwellenwert erreicht. Der Schwellenwert wurde so gewählt, dass er in der exponentiellen Phase der untersuchten PCR liegt. So konnten den C_T -Werten der unbekanntenen Proben *Template*-Kopienzahlen zugeordnet werden.

2.4.14.2 Absolute Quantifizierung mit SYBR GreenI

Für die nicht Sequenz-spezifische Detektion von PCR-Produkten wurden interkalierende Fluorochrome wie z.B. SYBR GreenI verwendet, die an dsDNA binden. Da diese Farbstoffe jedoch nicht nur an die spezifischen PCR-Produkte binden, sondern auch an unspezifische Nebenprodukte und *Primer*-Dimere, wurden im Anschluss an die eigentliche PCR-Reaktion Schmelzkurvenanalysen durchgeführt, um die Aussagekraft dieses Detektionssystems zu erhöhen. Dabei wurde die Temperatur langsam und kontinuierlich von 60°C auf 95°C erhöht, wodurch die dsDNA-Moleküle

denaturieren und die interkalierenden Farbstoffe freigesetzt werden. Die Abnahme der Fluoreszenz wird gemessen, wobei *Primer*-Dimere und unspezifische Produkte durch ihre abweichende Schmelztemperatur von den zu untersuchenden Amplifikaten unterschieden werden können. In dieser Arbeit wurde das QuantiTect SYBR Green PCR-Kit (QIAGEN, Hilden) verwendet, um absolute Quantifizierungen von DNA durchzuführen.

Tab. 2.25: Standard SYBR GreenI PCR-Ansatz

Komponente	Volumen/ Reaktion	Endkonzentration
2× QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	10µl	1×
<i>Primer</i> _for (10pmol/µl)	1,5µl	0,75µM
<i>Primer</i> _rev (10pmol/µl)	1,5µl	0,75µM
<i>Template</i> -DNA	xµl	
<i>Aqua bidest</i>	ad 20µl	

Tab. 2.26: Standard SYBR GreenI PCR-Profil

	Zeit	Temperatur	
Initialer Aktivierungsschritt	15min	95°C	Aktivierung der HotStar <i>Taq</i> DNA-Polymerase
Denaturierung	15sec	94°C	
<i>Annealing</i>	30sec	62°C	
Extension	45sec	72°C	Datenakquisition
Zyklenzahl	50		
Schmelzkurve			
Denaturierung	15sec	95°C	
<i>Annealing</i>	1min	60°C	
Denaturierung	15sec	95°C	

2.4.14.3 Absolute Quantifizierung mit *TaqMan*TM-Sonde

Im Vergleich zu den SYBR Green-Detektionssystemen sind Systeme mit DNA-Sonden, die an Fluorochrome gekoppelt sind (*TaqMan*TM-Sonden) Sequenz-spezifisch. Dadurch ist der Einfluss von unspezifischen Nebenprodukten und Pimerdimeren sehr viel geringer. *TaqMan*TM-Sonden sind kurze Oligonukleotide, die an ihrem 5'- bzw. 3'-Ende jeweils ein Fluorochrom (6-FAM als Reporter am 5'-Ende bzw. TAMRA als Quencher am 3'-Ende) tragen. Diese beiden Farbstoffe besitzen ein überlappendes Emissions- bzw. Absorptionsspektrum, wodurch der sogenannte Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) auftritt. Die Fluoreszenz des Reporters wird unterdrückt, solange er sich in enger räumlicher Nähe zum Quencher befindet. Das vom Fluorochrom emittierte Licht wird vollständig vom Quencher absorbiert, der dadurch selbst zur Fluoreszenz angeregt wird. Die Sonde wird so ausgewählt, dass deren Sequenz komplementär zu einem Sequenzabschnitt ist, der zwischen den verwendeten *Primern* liegt. Während des Amplifikations schritts verdrängt die Polymerase die *TaqMan*TM-Sonde. Durch ihre Exonukleaseaktivität wird die Sonde gleichzeitig auch hydrolysiert, wodurch die Fluorochrome freigesetzt werden und die Fluoreszenz des Reporters nicht länger durch den Quencher unterdrückt werden kann. Mit jedem Amplifikationszyklus steigt daher die detektierte Fluoreszenz des Reporters direkt proportional zur Anzahl der amplifizierten Zielsequenzen an.

Tab. 2.27: Standard *TaqMan* PCR-Ansatz

Komponente	Volumen/ Reaktion	Endkonzentration
10× PCR Puffer	10µl	1×
dNTPs (je 10mM)	1,67µl	670µM
MgCl ₂ (25mM)	2,5µl	2,5µM
<i>Primer</i> _for (10µM)	1,5µl	0,6µM
<i>Primer</i> _rev (10µM)	1,5µl	0,6µM
Sonde (10µM)	0,66µl	0,26µM
ROX (10µM)	0,33µl	0,132µM
HotStar <i>Taq</i> DNA-Polymerase [5U/µl]	0,4µl	
<i>Template</i> -DNA	xµl	
RNase freies H ₂ O	ad 25µl	

Tab. 2.28: Standard *TaqMan*TM-Sonden PCR-Profil

	Zeit	Temperatur	
Initialer Aktivierungsschritt	15min	95°C	Aktivierung der HotStar <i>Taq</i> DNA-Polymerase
Denaturierung	15sec	94°C	
<i>Annealing</i> /Extension	60sec	60°C	Datenakquisition
Zyklenzahl	45		

2.4.15 Reverse Transkriptase-PCR

Um virale Transkripte aus Gesamt-RNA nachzuweisen, wurde eine Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) durchgeführt. Hierzu wurde der *OneStep* RT-PCR Kit (QIAGEN, Hilden) verwendet. Der Enzym-Mix dieses Kits enthält eine Kombination aus Omniscript reverser Transkriptase, Sensiscript reverser Transkriptase und HotStar *Taq* DNA-Polymerase. Bei der RT-PCR wurde zunächst mit Hilfe der reversen Transkriptasen und Sequenz-spezifischen *Primern* cDNA aus dem gewünschten RNA-Molekül hergestellt, die dann in einer nachfolgenden PCR-Reaktion als *Template* diente. Mit Hilfe des *OneStep* RT-PCR Kits konnten die Synthese der cDNA und die anschließende PCR direkt aufeinander folgend in einem Reaktionsgefäß durchgeführt werden.

2.4.15.1 Relative Quantifizierung von Transkriptmengen mit *TaqMan*TM-Sonde

In dieser Arbeit wurde zur relativen Quantifizierung von Transkriptmengen das *OneStep* RT-PCR Kit (QIAGEN, Hilden) verwendet und in einem ABIPrism 7500 durchgeführt. Die zu untersuchende RNA wurde zunächst mit Hilfe Gen-spezifischer *Primer* und einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben, welche anschließend als *Template* für die *real-time* PCR diente. Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression der zu untersuchenden Gene in den Mutanten mit der Expression dieser Gene z.B. im WT oder in einer unbehandelten Probe (Kalibrator) verglichen. Dabei wird nicht die absolute Kopienzahl der zu untersuchenden Transkripte bestimmt, sondern nur deren relative Häufigkeit im Vergleich zum Kalibrator. Dazu werden die C_T -Werte der Virusmutanten und des WT für jedes zu untersuchende Gen und die endogene Kontrolle bestimmt. Der C_T -Wert stellt den Zyklus dar, in dem die Fluoreszenz der Proben einen festgelegten Schwellenwert erreicht. Um die eingesetzten RNA-Mengen vergleichen zu können, wurde als Bezugsgröße die Expression eines zellulären Gens verwendet (endogene Kontrolle). Die Aus-

wertung der relativen Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der Systemsoftware des ABIPrism nach der komparativen ($2^{-\Delta\Delta CT}$) Methode nach Livak und Schmittgen (2001).

Tab. 2.29: Standard TaqMan *OneStep* RT-PCR-Ansatz

Komponente	Volumen/ Reaktion	Endkonzentration
5× <i>OneStep</i> RT-PCR Puffer	5µl	1× (2,5mM MgCl ₂)
dNTPs (10mM jedes)	1,67µl	0,67µM
<i>Primer_for</i> (10µM)	1,5µl	0,6µM
<i>Primer_rev</i> (10µM)	1,5µl	0,6µM
Sonde (10µM)	0,66µl	0,26µM
<i>OneStep</i> RT-PCR Enzym Mix	1µl	
MgCl ₂ (25mM)	1,5µl	1,5mM
<i>Template</i> -RNA	xµl	1pg-2µg/Reaktion
<i>Aqua bidest</i>	ad 25µl	

Tab. 2.30: Standard TaqMan *OneStep* RT-PCR-Profil

	Zeit	Temperatur	
Reverse Transkription	30min	50°C	
Initialer Aktivierungsschritt	15min	95°C	Aktivierung der HotStar <i>Taq</i> DNA-Polymerase; Denaturierung der Reversen Transkriptase
Denaturierung	15sec	94°C	
<i>Annealing</i> /Extension	60sec	60°C	Daten Akquisition
Zyklenzahl	45		

2.4.15.2 Herstellung des DTR *in vitro*-Transkripts

Als Standard für die RT-qPCR wurden zur absoluten Quantifizierung *in vitro*-Transkripte eingesetzt, die mit dem MegaScript Sp6 Kit (Applied Biosystems/Ambion, Austin, USA) hergestellt wurden. Dazu wurden zuerst 10µg des linearisierten Vektors pSP64PolyA⁺_DTR, der die gewünschte DTR Matrizen-DNA enthielt, auf ein Agarosegel aufgetragen und mit Hilfe des QIA-

quick Gel Extraction Kits aufgereinigt und schließlich in 30µl RNase freiem H₂O eluiert und die DNA-Konzentration bestimmt. Zur Herstellung des DTR *in vitro*-Transkripts wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

Tab. 2.31: Standard-Ansatz zur Herstellung von *in vitro*-Transkripten

Komponente	Volumen/ Reaktion
ATP-Lösung	2µl
CTP-Lösung	2µl
GTP-Lösung	2µl
UTP-Lösung	2µl
10× Puffer	2µl
Enzym-Mix	2µl
linearisierte DNA	1µg
Nuklease-freies H ₂ O	ad 20µl

Dieser Ansatz wurde 2h bei 37°C inkubiert. Danach wurde 1µl DNase (MegaScript Sp6 Kit (Applied Biosystems/Ambion, Austin, USA)) dazugegeben, ein weiteres Mal für 15min bei 37°C inkubiert und schließlich die RNA mit dem RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden) aufgereinigt und in 60µl RNase freiem H₂O eluiert. Die genaue Versuchsbeschreibung ist unter <http://www.ambion.com/catalog/CatNum.php?1330> nachzulesen.

Nach der Aufreinigung der *in vitro*-Trankripte wurde deren Konzentration gemessen und die Transkriptmenge pro µl bestimmt:

$$\text{Teilchenmenge (Transkripte/}\mu\text{l)} = \frac{6,022 \times 10^{23} \text{ (Kopien/mol)} \times \text{RNA-Konzentration (g/}\mu\text{l)}}{\text{MW (g/mol)}}$$

MW für ssRNA: Größe des *in vitro*-Transkripts (b) × 340 Dalton/b

2.4.15.3 Absolute Quantifizierung von Transkriptmengen durch RT-qPCR

Bei der Transkriptanalyse mittels RT-qPCR wurden, analog zur qPCR (s. 2.4.14) *in vitro* Transkripte als externer Standard zur Quantifizierung verwendet. Um die Proben direkt miteinander vergleichen zu können, wurde jeweils $\frac{1}{10}$ des Eluats in die Reaktion eingesetzt. Die Quantifizierung erfolgte wie unter 2.4.15.1 beschrieben mit dem OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN, Hilden) in einem ABIPrism 7500. Der RT-qPCR-Ansatz, sowie das RT-qPCR-Profil sind in Tab. 2.29 und Tab. 2.30 aufgeführt.

2.4.16 Herstellung rekombinanter mCMV mittels BAC-Technologie

Die Generierung von mCMV-Rekombinanten, die für das Gen des simian DTR kodieren, erfolgte mittels des Zwei-Schritt Rekombinationsverfahrens im *E. coli*-Stamm DH10B.

Die Insertion einer HA-Epitop-Sequenz aus dem Hämagglutinin des Influenza-A-Virus an das 3'-Ende des *DTR*-Gens wurde anschließend mit dem Ein-Schritt Rekombinationsverfahren im *E. coli*-Stamm SW105 durchgeführt.

2.4.16.1 Mutagenese mittels Zwei-Schritt Rekombinationsverfahren

Die Zwei-Schritt Rekombinationsmutagenese in *E. coli* DH10B wurde in Anlehnung an die Verfahren von O'Connor *et al.* (1989), Messerle *et al.* (1997), Borst *et al.* (1999; 2004), sowie Wagner *et al.* (1999) durchgeführt. Die zur Herstellung der Rekombinanten benötigte *Major Immediate Early Promotor Enhancer* (MIE-PEEP)-Region (Kropp *et al.*, 2009), sowie das *DTR*-Gen wurden über mehrere Zwischenschritte in das Ursprungs-*shuttle*-Plasmid pST76K_SR (Pósfai *et al.*, 1997; Hobom *et al.*, 2000; Borst *et al.*, 2004) kloniert (s. 3.1.1. Um eine effektive und spezifische homologe Rekombination zwischen *shuttle*-Plasmid und mCMV-BAC-Plasmid zu ermöglichen, muss die Mutation von gleich langen Sequenzen, homolog zum Integrationsort (1,5kbp bis 3kbp zu jeder Seite, Smith, G. R., 1988), flankiert werden.

Verwendete Materialien:

- LB-Agarplatten mit 5% (w/v) Saccharose
- | | |
|------------|----------|
| Saccharose | 5% (w/v) |
| LB-Medium | ad 100µl |
- Lösung immer frisch ansetzen und steril filtrieren.

I. Co-Transformation des *shuttle*-Plasmids und Bildung der Co-Integrate

50µl elektrokompente DH10B (s. 2.4.3.1), die das zu mutierende mCMV-BAC-Plasmid enthielten, wurden mit 1ng *shuttle*-Plasmid-DNA elektrotransformiert (s. 2.4.3.3) und für 1h in LB-Medium (ohne Antibiotika) bei 30°C geschüttelt. Der gesamte Ansatz wurde anschließend auf LB-Cam-Kan-Platten ausplattiert und für ein bis zwei Tage bei 30°C im Brutschrank inkubiert. Bei diesem Schritt erfolgt eine erste homologe Rekombination, die zur Bildung von Co-Integraten führt. Diese haben die vollständige *shuttle*-Plasmid-DNA in das mCMV-BAC-Plasmid integriert.

II. Anreicherung der Co-Integrate und Entfernung der *shuttle*-Plasmide

Um Co-Integrate identifizieren zu können, wurden zehn Kolonien aus Schritt I als Verdünnungsausstriche auf LB-Cam-Kan-Platten ausgestrichen und bei exakt 43°C im Brutschrank üN inkubiert. Bei dieser Temperatur können lediglich Co-Integrate replizieren, da bei nicht integrierten *shuttle*-Plasmiden ein falsch gefaltetes *RepA*-Protein entsteht, das den Temperatur-sensitiven Replikationsursprung pSC101 nicht mehr induzieren kann. Für den darauf folgenden Schritt ist es essentiell, dass lediglich große Einzelkolonien gepickt werden. Gegebenenfalls müssten die Bakterienkolonien erneut ausgestrichen werden, um große Einzelkolonien zu erhalten.

III. Co-Integrat-Auflösung

Zehn Kolonien der aus Schritt II bei 43°C inkubierten LB-Agarplatten wurden auf LB-Cam-Platten als Verdünnungsausstrich ausplattiert und bei ungefähr 30h bei 30°C inkubiert. Dieser Schritt diente zur Auflösung von Co-Integraten durch weitere homologe Rekombination. Die resultierenden Klone sind eine Mischung aus Bakterien mit aufgelösten Co-Integraten und Bakterien mit nicht aufgelösten Co-Integraten.

IV. Selektion gegen nicht aufgelöste Co-Integrate

Zur Selektion gegen nicht aufgelöste Co-Integrate wurden zehn Kolonien aus Schritt III auf LB-Cam-Platten mit Saccharose (5% (w/v)) in einem Verdünnungsausstrich vereinzelt und ein weiteres Mal für 30h bei 30°C inkubiert. Bakterien, welche nicht aufgelöste Co-Integrate tragen, können in Anwesenheit von Saccharose nicht replizieren, da sie das *SacB*-Gen enthalten. Es steht unter Kontrolle des *Lac*-Promotors, der in Gegenwart von Saccharose aktiviert wird. Dies führt zur Expression des Exoenzyms Levan-Saccharase, welches die Synthese des Polysaccharids Levan aus Saccharose katalysiert. Dadurch kommt es zur Akkumulation von Levan im periplasmatischen Raum mit letalen Folgen für *E. coli*. Dieser Schritt muss mindestens zweimal wiederholt werden.

V. Testen auf aufgelöste Co-Integrate

Aufgelöste Co-Integrate sind Kan-sensitiv und können darüber identifiziert werden. Dazu wurden 100 Einzelkolonien aus Schritt IV parallel auf Kan- und Cam-Platten üN bei 37°C auf ihre Vermehrung hin getestet. Zu beachten ist, dass zuerst die Kan-Platte und dann die Cam-Platte zu beimpfen ist.

VI. Charakterisierung Kan-sensitiver Klone

Von zehn Kan-sensitiven Klonen wurde je eine 10ml LB-Cam Übernachtskultur beimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Am folgenden Tag wurde daraus eine Dauerkultur angelegt (s. 2.4.2.3) und die BAC-DNA isoliert (s. 2.4.4.2), um die globale Integrität des mCMV-Genoms durch Restriktionsanalysen (s. 2.4.7) zu bestätigen. Allerdings konnte man dadurch nicht in jedem Fall die eingebrachten Punktmutationen bzw. die klonierten Gene nachweisen. Hierzu wurden spezifische PCRs durchgeführt, die Amplifikate aufgereinigt und anschließend die PCR-Produkte sequenziert.

VII. Virusrekonstitution

Die anschließende Virusrekonstitution erfolgte in MEF. Hierzu wurde die mCMV-BAC-DNA von positiv sequenzierten Klonen isoliert (s. 2.4.4.5), ein weiteres Mal die Integrität des BACs durch Restriktionsenzymverdau (s. 2.4.7) getestet und MEF mit der BAC-DNA transfiziert (s. 2.2.5.2).

2.4.16.2 Mutagenese mittels Ein-Schritt Rekombinationsverfahren

Die Durchführung der Ein-Schritt Rekombinationsmutagenese von mCMV-BAC-Plasmiden erfolgte in Anlehnung an die Arbeiten von Oliner *et al.* (1993), Zhang *et al.* (1998) und Wagner und Koszinowski (2004).

Verwendete Materialien:

- Glycerinlösung (s. 2.4.3.1)
 - L-Arabinoselösung
 - L-Arabinose 10% (w/v)
 - LB-Medium ad 100µl
- Lösung immer frisch ansetzen und steril filtrieren.

I. Transformation des BAC-Plasmids in *E. coli* SW105

Die Insertion der HA-Epitop-Sequenz erfolgte am 3'-Ende des *DTR*-Gens. Dazu musste zuvor das zu mutierende BAC-Plasmid mCMV-BAC_ΔIE2DTR in *E. coli* SW105 transformiert werden. Die verwendeten Bakterien exprimieren, durch Arabinose induziert, das Gen für die zur späteren homologen Rekombination über die FRT-Erkennungssequenzen benötigte FLP-Rekombinase (McLeod *et al.*, 1986). Zur Herstellung der elektrokompenten *E. coli* SW105 wurden 5ml LB-Medium ohne Antibiotika angeimpft und bei 32°C üN schüttelnd inkubiert. Die elektrokompenten Bakterien wurden am nächsten Tag wie unter 2.4.3.1 beschrieben hergestellt. Die Transformation der frisch isolierten BAC-DNA (s. 2.4.4.5) erfolgte wie unter 2.4.3.3

beschrieben. Inkubiert wurden sowohl die Transformationsansätze als auch die LB-Platten mit Cam bei 32°C. Von den gewachsenen Kulturen wurden zehn bis 20 Kolonien gepickt, Dauerkulturen angelegt und die Integrität des BAC-Plasmids durch einen Restriktionsenzymverdau kontrolliert. Ein Klon mit intaktem BAC-Plasmid wurde ausgewählt und in Schritt II eingesetzt.

II. Herstellung elektrokompetenter *E. coli* SW105 und Induktion des RED-Systems

Von dem zuvor ausgewählten Klon, der das zu mutierende BAC-Plasmid enthält, wurden elektrokompetente Bakterien hergestellt. 50ml der 100ml-Übernachtskultur (LB-Medium mit Cam, 32°C) wurden bei einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,6 entnommen und das RED-System (Rekombinationssystem des Phagen gamma) durch Inkubation bei 42°C für 15min induziert. Der Rest der Übernachtskultur wurde als nicht induzierte Kontrolle weitergeführt. Danach wurden die Bakterien sofort für 10min auf Eis inkubiert und anschließend für 5min bei 0°C pelletiert (3939×g; Heraeus Labofuge 400R, Rotor: 8179). Die Zellen wurden mit einer vorgekühlten 25ml-Pipette in einem Kulturvolumen vorgekühlter 10%-iger Glycerinlösung resuspendiert und ein weiteres Mal zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, bis das Pellet schließlich in 250µl gekühlter Glycerinlösung aufgenommen und à 50µl in gekühlte Reaktionsgefäße aliquottiert wurde. 50µl der frisch hergestellten elektrokompetenten Bakterien wurden sofort für die Transformation in Schritt IV verwendet.

III. Herstellung des PCR-Fragments mit viralen Homologien an den Enden

Parallel zur Herstellung der elektrokompetenten SW105 wurde ein Amplifikat mittels PCR aus dem Plasmid pGP704-Kan amplifiziert. Das Amplifikat enthält die Kan-Resistenzkassette aus dem Plasmid und zusätzlich die, die Mutation flankierenden viralen homologen Sequenzen und die FRT-Erkennungssequenz, die durch die Gestaltung der *Primer* hinzugefügt wurden. Durch die FRT-Erkennungssequenz kann später der Selektionsmarker (Kan-Resistenz) mit Hilfe der FLP-Rekombinase aus dem BAC-Plasmid entfernt werden. Der Bereich zwischen Oligonukleotidbindungsort und viraler Homologie kann für das Einfügen zusätzlicher DNA-Sequenzen genutzt werden, wie z.B. in dieser Arbeit die Insertion der HA-Epitop-Sequenz am 3'-Ende des *DTR*-Gens. Die PCR erfolgte mit der *ProofStart* DNA-Polymerase (QIAGEN, Hilden) wie unter 2.4.13 beschrieben. Das Amplifikat wurde anschließend über ein Agarosegel aufgereinigt, um es in die Transformation (Schritt IV) einsetzen zu können.

IV. Transformation des PCR-Fragments in Arabinose-induzierbare Bakterien

Die Transformation von 50µl elektrokompetenten *E. coli* SW105 (aus Schritt II) erfolgte mit 5µl des frisch hergestellten PCR-Amplifikats, das zuvor über ein Agarosegel (s. 2.4.9) aufgereinigt wurde. Die verwendeten Elektroporationsküvetten wurden vorgekühlt und der Transformations-

ansatz zusätzlich für 1min bis 5min auf Eis gekühlt. Nach der Elektrotransformation (s. 2.4.3.2) wurde der Ansatz für 1,5h bei 32°C schüttelnd inkubiert, schließlich auf LB-Agarplatten mit Cam und Kan (s. 2.4.2.1) ausplattiert und üN bei 32°C inkubiert. Einzelkolonien wurden gepickt und für die Exzision des Selektionsmarkers (Schritt V) vorbereitet.

V. Exzision des mit FRT-Sequenzen flankierten Selektionsmarkers durch Arabinose-Induktion

Die Expression des von *E. coli* SW105 kodierten *FLP-Rekombinase*-Gens wird durch Arabinose induziert. Zur Herstellung der mit Arabinose induzierbaren Bakterien wurden 5ml LB-Medium mit Cam und Kan mit einer Einzelkolonie aus Schritt IV beimpft und üN bei 32°C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurden 10ml LB-Medium mit Cam und Kan in einem kleinen Erlenmeyerkolben im Verhältnis 1:10 mit der Übernachtskultur beimpft und bei 32°C bis zu einer OD₆₀₀ von ungefähr 0,5 inkubiert. Bei der entsprechenden OD wurden 100µl 10%-ige L-Arabinoselösung (Endkonzentration der Arabinose=0,1%) zu der Kultur gegeben und die FLP-Rekombinase durch Inkubation für 1h bei 32°C induziert. Anschließend wurde die Kultur 1:1000, 1:10000 und 1:100000 in LB-Medium verdünnt, je 50µl auf LB-Agarplatten mit Cam bzw. Kan ausplattiert und bei 32°C üN inkubiert. Durch die FLP-Rekombination verlieren die Bakterien ihre Kan-Resistenz, wodurch sie ausschließlich auf LB-Platten mit Cam wachsen. Die auf LB-Platten mit Cam gewachsenen Kolonien wurden ein weiteres Mal auf Kan- bzw. Cam-Platten übertragen. Dabei war darauf zu achten, dass die mit einer sterilen Pipettenspitze gepickten Kolonien zuerst auf die Kan-Platte, dann auf die Cam-Platte transferiert wurden. BAC-DNA wurde von den Bakterienklonen isoliert (s. 2.4.4.5), die ausschließlich auf Cam-Platten gewachsen sind. Nach der Überprüfung der Integrität des BAC-Plasmids und des HA-tags wurde die BAC-DNA zur Transfektion von MEF (s. 2.4.3.3) eingesetzt.

2.5 Histologische Methoden

In dieser Arbeit wurden immunhistochemische Methoden angewandt, um virale Proteine in der Leber infizierter Tiere nachzuweisen. Der Nachweis des viralen IE1-Proteins in der Leber diente der Quantifizierung mCMV-WT.BAC und aller DTR-Mutanten infizierter Leberzellen.

2.5.1 Formalin-Fixierung und Einbetten der Organe

Damit Gewebe möglichst natürlich erhalten bleibt, und es in seiner ursprünglichen Architektur beurteilt werden kann, müssen die entnommenen Organe fixiert werden.

Verwendete Materialien:

- gepufferte Formalinlösung

KH_2PO_4	9,07g
Na_2HPO_4	11,86g
Formalin (37% Stammlösung)	110ml

KH_2PO_4 und Na_2HPO_4 in 890ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$ lösen.
Anschließend Formalin hinzugeben.
Mit NaOH auf pH 7,5 einstellen.

Durchführung:

Die Organe wurden sofort nach der Entnahme in eine 4%-ige wässrige Formalinlösung gegeben und üN (8h bis 18h; je nach Größe des Gewebes) bei RT fixiert. Nach der Fixierung wurde das Gewebe 2h bis 6h in Leitungswasser gewässert, um das Fixierungsmittel zu entfernen. Anschließend erfolgte die Entwässerung der Organe durch eine aufsteigende Alkoholreihe mit Isopropanol:

Isopropanol 20%(v/v)	45min
Isopropanol 40%(v/v)	45min
Isopropanol 60%(v/v)	45min
Isopropanol 80% (v/v)	45min
Isopropanol 90% (v/v)	45min
Isopropanol 100% (v/v)	3×45min

Es folgt eine 3-stündige Inkubation in Xylol, wobei die Organe nach jeweils 1h in frisches Xylol überführt wurden. Anschließend wurden die Organe für 18h bei 55°C in Paraffin inkubiert, bevor sie am nächsten Tag in heißes Paraffin (55°C bis 70°C) eingebettet wurden:

1h	55°C
8-16h	55°C
4h	55°C

2.5.2 Anfertigung von histologischen Schnitten

Zum Anfertigen der Schnitte wurde ein Mikrotom benutzt, das es ermöglicht bis zu 0,5µm dünne Schnitte eines Gewebes anzufertigen. Üblicherweise beträgt die Schnittdicke etwa 2µm bis 6µm. Hierzu wurden die Paraffinblöcke zuerst auf -20°C gekühlt, bevor die Schnitte mit dem Mikrotom angefertigt werden konnten. Die erhaltenen Schnitte wurden auf einem Kaltwasserbad (ca. 20°C) aufgefangen und dann auf einem Heißwasserbad (ca. 45°C) gestreckt und glatt auf einen mit Silan beschichteten Objektträger aufgezogen. Die aufgezogenen Schnitte wurden üN bei 37°C bis 45°C getrocknet und am nächsten Morgen für die histologische Färbung verwendet.

2.5.3 Deparaffinierung und Rehydratisierung der Schnitte

Die zuvor angefertigten Paraffinschnitte der Organe mussten vor der Immunhistochemie (IHC) mit Xylol (3×5min) deparaffiniert werden, um die Organschnitte freizulegen. Danach folgte die Rehydratisierung in einer absteigenden Alkoholreihe:

Isopropanol 100%(v/v)	2×3min
Isopropanol 90%(v/v)	3min
Isopropanol 70%(v/v)	3min
Isopropanol 50% (v/v)	3min

Anschließend wurden die Schnitte für einige Minuten mit H_2O_{dein} gespült. Die Proteine konnten dann in der IHC detektiert werden.

2.5.4 mCMV-IE1-spezifische Immunhistochemie

Die IHC ermöglicht die Quantifizierung infizierter Zellen, z.B. in der Leber, und zeigt somit die Vermehrung der zu untersuchenden Viren unter verschiedenen experimentellen Bedingungen, z.B. mit und ohne DT-Behandlung. Dazu benötigt man spezifische Ak, die gegen das gesuchte Antigen gerichtet sind. Um die Viren nachweisen zu können, wurde hier das virale Protein IE1 gewählt, das mit Hilfe der Avidin-Biotin-Peroxidase-Färbung (ABC-Peroxidase-Methode) detektiert werden kann.

Diese Methode ermöglicht einen hoch sensitiven Nachweis mCMV infizierter Zellen *in situ* (Podlech *et al.*, 2002). Als Substrat der Peroxidase-Reaktion dient dabei Diaminobenzidin (DAB), das in Verbindung mit Nickel zu einer Schwarzfärbung des Gewebes an der Stelle des Antigens führt. Mit dieser Methode wurden die Organe auf das virale IE1-Protein untersucht, dessen Expression ungefähr 2h nach der Infektion beginnt. Während der L-Phase des viralen Replikationszyklus kommt es zur Akkumulation des Proteins in Einschlusskörperchen, die im Nukleus lokalisiert sind.

Verwendete Materialien:

- Trypsinlösung

KCl	2,7mM
NaCl	137mM
KH ₂ PO ₄	1,5mM
NaH ₂ HPO ₄ ×2H ₂ O	8,1mM
EDTA×2H ₂ O	3,4mM
H ₂ O _{demin}	ad 1000ml

pH-Wert mit NaOH auf 7,4 einstellen und autoklavieren.
Vor Gebrauch 1,25g Trypsin (Difco, USA) (1:250) zugeben.
- Peroxidase-Blockierungslösung

Methanol	30ml
PBS	30ml
H ₂ O ₂ (30% (v/v))	1ml
- 10× TBS-Puffer

Tris	1M
NaCl	1,5mM
H ₂ O _{demin}	ad 1000ml

Mit HCl auf pH 7,4 einstellen.
Puffer vor Gebrauch 1:10 mit H₂O_{demin} verdünnen.
- BSA-TBS-Stammlösung

BSA	10% (w/v)
1× TBS	ad 100ml

Lösung bei -20°C lagern.
Lösung vor Gebrauch 1:10 mit 1× TBS verdünnen und bei -20°C lagern.
- Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (Vectastain ABC Kit PK-4000)

Reagenz A	1µl
Reagenz B	1µl
BSA-TBS, pH 7,5 (1% (v/v))	ad 100µl
- Substrat-Färbelösung

DAB	10mg
Tris/HCl (50mM) pH 7,5	50ml
NiSO ₄ ×6H ₂ O	75mg

Lösung vor Gebrauch filtrieren, anschließend 17µl H₂O₂ (30% (v/v)) zugeben.

Durchführung:

Vor der histologischen Färbung mit dem IE1-spezifischen Ak wurden die rehydrierten Gewebeschnitte für 15min bei 37°C in Trypsinlösung inkubiert und anschließend 3×1min in H₂O_{demin} gespült. Es folgte eine 35-minütige endogene Peroxidase-Blockierung mit Methanol-H₂O₂ bei RT. Nachdem die Organschnitte drei weitere Male für je 1min in TBS gespült wurden, erfolgte die Inkubation in NS aus Kaninchen (invitrogen Life Technologies, Karlsruhe; 1:10 verdünnt in BSA-TBS) für 20min in einer feuchten Kammer zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen. Das Serum wurde entfernt und im Anschluss danach erfolgte die Inkubation mit dem Primär-Ak α -IE1 (Croma 101; 1:250 (v/v) verdünnt in BSA-TBS (1%)) mit NS (1:10 (v/v) in BSA-TBS). Die Inkubation erfolgte für 60min in einer feuchten Kammer bei RT. Nach dreimaligem Spülen der Schnitte mit TBS erfolgte die Inkubation mit dem Sekundär-Ak (Ziege- α -Maus IgG-(Fab)-Biotin) 1:200 (v/v) in BSA-TBS gemischt. Die Inkubation erfolgte für 30min bei RT in einer feuchten Kammer. Die Organschnitte wurden dreimal für je 1min in TBS gespült, um nicht gebundene Ak zu entfernen. Anschließend folgte die Inkubation mit dem frisch angesetzten Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex für 30min in einer feuchten Kammer bei RT.

Danach wurden die Organschnitte ein weiteres Mal für 3×10min in TBS gespült und schließlich erfolgte die Substratreaktion durch Zugabe der Substrat-Färbelösung. Die Färbereaktion wurde nach 10min durch dreimaliges Waschen in TBS abgestoppt. Anschließend erfolgte die Gegenfärbung der Schnitte durch Hämatoxylin für 2sec, wodurch eine bläuliche unspezifische Hintergrundfärbung entsteht. Zum Dehydrieren der Gewebeschnitte wurden diese ein weiteres Mal in einer aufsteigenden Isopropanolreihe inkubiert:

Isopropanol 50%(v/v)	30sec
Isopropanol 70%(v/v)	30sec
Isopropanol 90%(v/v)	30sec
Isopropanol 100% (v/v)	2×30sec

Abschließend wurden die Schnitte getrocknet, dreimal in Xylol geschwenkt und durch Eindecken mit einem Deckgläschen und dem synthetischen Einschlussmittel Entellan (Merck, Darmstadt) dauerhaft konserviert.

2.6 Biochemische Methoden

2.6.1 Gesamtproteinextraktion aus transfizierten bzw. infizierten Zellen

Verwendete Materialien:

- Lysepuffer

NaCl	0,2M
MgCl ₂	1,5mM
EDTA	4mM
Triton X-100	1%
DTT	0,5mM
HEPES pH 7,7	20mM
- Proteinase Inhibitor (PI), (Complete, Roche, Mannheim)

Durchführung:

Um einzelne Proteine nach einer Transfektion (s. 2.2.5.1) bzw. Infektion (s. 2.3.5) von Zellen im Western Blot nachweisen zu können, mussten Zelllysate hergestellt werden. Nach einer definierten Zeit nach der Transfektion/Infektion wurde das Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Mit einem sterilen Zellschaber wurden anschließend die Zellen von der Kulturschale abgelöst, in dem verbliebenen Rest PBS aufgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt und bei $1000 \times g$ und $4^{\circ}C$ für 5min zentrifugiert (Eppendorf centrifuge 5417R, Rotor: F45-30-11). Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in 200 μ l Lysepuffer resuspendiert. Nach der Inkubation für 10min bis 15min auf Eis, wurde das Zelllysate für 15min bis 30min bei maximaler Geschwindigkeit und $4^{\circ}C$ zentrifugiert (Eppendorf centrifuge 5417R, Rotor: F45-30-11). Im Überstand befanden sich die gelösten zellulären Proteine und Membranproteine. Von der löslichen Fraktion wurde die Gesamtproteinmenge durch einen BCA-Test (s. 2.6.2) bestimmt und bei $-20^{\circ}C$ gelagert.

2.6.2 Proteinquantifizierung

Die Proteinquantifizierung erfolgte photometrisch mit dem BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Pierce, Bonn) (Smith *et al.*, 1985). Grundlage hierzu ist die Biuret-Reaktion, die Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} durch Cystein, Tryptophan und Tyrosin unter alkalischen Bedingungen. Bicinchonimin-Säure (BCA) bildet mit Cu^{1+} ein Chelat, dessen Absorptionsmaximum bei 562nm liegt. Die Absorption steigt in einem Konzentrationsbereich von 20 μ g/ml bis 2mg/ml linear zur Proteinkonzentration an. Dies ermöglicht es, zu jeder Proteinquantifizierung eine Stan-

dardreihe mit BSA (Bovines Serum Albumin) als Eichgerade zu erstellen. Da es sich bei dieser Reaktion um keine echte Endpunktmethode handelt, läuft die Farbreaktion auf unbestimmte Zeit weiter. Deshalb ist es wichtig, alle Proben, wie auch den Standard, zur gleichen Zeit zu pipettieren. Um die Pipettierverzögerung auszugleichen, folgte ein 30-minütiger Inkubationsschritt bei 37°C, bevor die Farbreaktion detektiert wurde.

Genauere Angaben sind unter <http://www.piercenet.com/files/1296as8.pdf> zu erhalten.

2.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

In dieser Arbeit wurde ausschließlich die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) zur Auftrennung von Proteinen eingesetzt. Hierbei wurden die aufzutrennenden Proteine mit dem Detergenz SDS versetzt, um die Eigenladung der Proteine effektiv zu überdecken. Es bilden sich Mizellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit, sodass eine Trennung der Proteine nach deren molekularen Massen erfolgt.

Verwendete Materialien:

- 4× Trenngelpuffer

SDS	0,4%
Tris/HCl (pH 8,8)	1,5mM
- 4× Sammelgelpuffer

SDS	0,4%
Tris/HCl (pH 6,8)	0,5mM
- 5× Elektrodenspuffer

Glycin	960mM
SDS	0,5%
Tris/HCl (pH 8,3)	125mM
- 5× Lämmli-Probenpuffer

β -Mercaptoethanol	1,5M
SDS	4%
Glycin	20%
Bromphenolblau	0,04%
Tris/HCl (pH 6,8)	125mM

Durchführung:

Die Proben wurden mit $\frac{1}{5}$ Volumen 5× Laemmli-Probenpuffer (Laemmli, 1970) versetzt und 5min bei 95°C gekocht. Die Auftrennung erfolgte in selbst gegossenen Polyacrylamidgelen, deren Zusammensetzung in Tab. 2.32 beschrieben ist.

Tab. 2.32: Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels

	Sammelgel (4%)	Trenngel (12,5%)
Acrylamidlösung (30%)	1,5ml	7,2ml
4× Sammelgelpuffer	2,82ml	–
4× Trenngelpuffer	–	4,5ml
<i>Aqua bidest</i>	6,93ml	6,3ml
APS (10%)	130µl	130µl
TEMED	20µl	20µl

Zunächst wurde an das Gel eine Spannung von 100V angelegt, bis die Proben ins Trenngel eingelaufen waren. Dann wurde die Spannung auf 150V erhöht. Sobald das Bromphenolblau des Probenpuffers am unteren Ende des Trenngels herauslief, wurde die Auftrennung beendet. Parallel zu den Proben wurde ein Protein-Standard (Page Ruler Prestained Protein Ladder, Fermentas, St. Leon-Rot) aufgetragen, um das Molekulargewicht detektierter Proteinbanden zuordnen zu können.

2.6.4 Western Blot

Verwendete Materialien:

- Bjerrum-Schäfer-Nielsen Transferpuffer

Glycin	39mM
Ethanol	20%
SDS	1,3mM
Tris/HCl (pH 9,2)	48mM
- 10× PBS

NaCl	140mM
KCl	2,7mM
Na ₂ PO ₄	6,5mM
K ₂ HPO ₄ (pH 7,4)	1,5mM
- Blockierungslösung

Magermilchpulver (MMP)	5%
Triton X-100	0,1%
in PBS	
- Ak-Verdünnungslösung und Waschlösung I

MMP	1%
Triton X-100	0,1%
in PBS	

- Waschlösung II
Triton X-100 0,1%
in PBS

Durchführung:

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine (s. 2.6.3) wurden diese im *semidry*-Verfahren auf eine Polyvenyliden Fluorid- (PVDF) Membran (Millipore, Schwalbach) (Pluskal, 1986) transferiert. Hierzu wurden jeweils zwei Lagen Whatman-Papier, die zuvor in Transferpuffer getränkt wurden, luftblasenfrei unter und über die Membran und das Gel gelegt. Der Transfer erfolgte bei $0,8\text{mA}/\text{cm}^2$ für 90min. Die Verwendung des vorgefärbten Markers (s. 2.6.3) ermöglicht die Überprüfung des Transfers auf die Membran. Nach dem Blot-Vorgang wurde die Membran für 1h mit der Blockierungslösung inkubiert. Anschließend wurde der Primär-Ak in ungefähr 7ml Ak-Verdünnungslösung aufgenommen, mit der Membran eingeschweißt und üN auf einem Schütteltisch bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran $5 \times 10\text{min}$ mit Waschlösung I gewaschen. Danach wurde der Sekundär-Ak 1:10000 in Ak-Verdünnungslösung verdünnt und 1h mit der Membran inkubiert. Nach dem Waschen mit Waschlösung II konnte die Detektion der Proteine (s. 2.6.5) erfolgen.

2.6.5 Detektion der Proteine

Durchführung:

Zur Detektion der Proteine nach dem Transfer auf die PVDF-Membran wurde das ECL Plus Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, München) verwendet. Die Detektion erfolgt hier über Chemilumineszenz. Durch die Oxidation des zyklischen Diacylhydrazids Luminol entsteht in Gegenwart von H_2O_2 und Meerrettichperoxidase als Zwischenprodukt ein Acridinium-Ester, der durch H_2O_2 weiter oxidiert. Das Zwischenprodukt emittiert Licht mit einem Emissionsmaximum bei 430nm, welches mit einem Autoradiographiefilm detektiert werden kann. Die PVDF-Membran wurde laut Arbeitsanweisung behandelt und das Signal schließlich auf einem Autoradiographiefilm (Lumi-Film Chemiluminiscent Detection Film, Roche, Mannheim) detektiert.

Ausführliche Angaben sind dem Firmenprotokoll unter http://www6.gelifesciences.com/apatrix/upp00919.nsf/Content/LD_160135302-G350 zu entnehmen.

2.6.6 Coomassie-Färbung der PVDF-Membran

Verwendete Materialien:

- Färbelösung

Coomassieblau (G250)	0,1%
Essigsäure	10%
technischer Ethanol	50%
- Entfärbelösung

Essigsäure	7,5%
technischer Ethanol	25%

Durchführung:

Die Proteine auf der PVDF-Membran können durch die Inkubation mit der Färbelösung sichtbar gemacht werden (Hancock and Tsang, 1983). Dazu wurde die Membran 5min mit Färbelösung inkubiert und anschließend der überschüssige Farbstoff durch dreimaliges Waschen für je 15min in etwa 50ml Entfärbelösung entfernt. So konnte eine gleichmäßige Beladung des SDS-Gels überprüft werden.

2.6.7 Serumaufreinigung über Peptidsäulen

Um das aus Tieren gewonnene Antiserum für histologische und biochemische Versuche verwenden zu können, muss es affinitätsgereinigt werden. Dazu wird eine Peptidsäule (Peptide Specialty Laboratories, Heidelberg) verwendet, die eine Matrix aus A-Sepharose enthält, an die das synthetisierte Peptid über seine Cystein-AS gebunden ist. Bei der Aufreinigung binden die Ak spezifisch an die Peptide und werden schließlich von der Säule eluiert. Unerwünschte Bestandteile des Antiserums können nicht an die Säule binden und werden beim Waschen entfernt.

Verwendete Materialien:

- Protein A-Säule mit spezifischem Peptid
- Glycinpuffer

Glycin	0,1M%
<i>Aqua bidest</i>	ad 1000ml
Lösung mit HCl auf pH 2,4 einstellen und autoklavieren.	
- Natriumphosphat-Puffer

NaH_2PO_4	10mM
<i>Aqua bidest</i>	ad 1000ml
Lösung mit HCl auf pH 6,8 einstellen und autoklavieren.	

- Kaliumphosphat-Puffer

K_2HPO_4	2mM
<i>Aqua bidest</i>	ad 1000ml
- Glycerin + 0,05% NaN_3

Glycerin (86%)	
NaN_3 (Endkonzentration in Glycerin)	0,05%
- PBS + 0,05% NaN_3

PBS	
NaN_3 (Endkonzentration in PBS)	0,05%

Durchführung:

Nach Angaben des Herstellers (Pepide Specialty Laboratories, Heidelberg) wurden 5ml des Antiserums mit 5ml PBS verdünnt und mit 0,5ml der zuvor mit 5ml PBS äquilierten Matrix üN bei 4°C rotierend inkubiert. Die Suspension wurde anschließend über die Säule gegeben und der Durchfluss ein weiteres Mal über die Säule gegeben. Anschließend wurde die Säulenmatrix dreimal mit 10ml PBS und zweimal mit Natriumphosphat-Puffer gewaschen, bevor das Antiserum mit 10×0,5ml Glycinpuffer von der Säule eluiert werden konnte. In die Reaktionsgefäße wurden zuvor 35µl K_2HPO_4 (2M) vorgelegt, mit dem Antiserum gemischt und sofort auf Eis gekühlt. Die einzelnen Fraktionen wurden im Western Blot (s. 2.6.4) auf ihre Spezifität getestet und das gereinigte Serum à 100µl aliquottiert und mit dem gleichen Volumen Glycerin mit NaN_3 versetzt, gemischt und bei -70°C gelagert.

Zur Regeneration der Säulenmatrix wurde diese einmal mit 10ml Na-Phosphat, zweimal mit 10ml PBS und zweimal mit 10ml PBS mit 0,05% NaN_3 gewaschen. Die Säulenmatrix kann stehend in PBS mit 0,05% NaN_3 bei 4°C für ein Jahr gelagert werden.

2.6.8 Immunfluoreszenz

Verwendete Materialien:

- Blocklösung

FCS	15ml
Triton X-100	3ml
PBS	ad 100ml

 Lösung aliquottieren à 10ml und bei -20°C lagern.
- PFA/Saccharose

PFA	8%
Saccharose	8%

 PFA und Saccharose immer frisch zu gleichen Teilen mischen.

- Aceton
- Hoechst 33342

Durchführung:

Um die Deckgläschen zum Aussäen der MEF fettfrei zu bekommen, wurden diese für 30min in Aceton gebadet und anschließend getrocknet und autoklaviert. Zur Infektion mit mCMV wurden 7×10^4 Zellen in 1ml Kulturmedium auf die Deckgläschen ausgesät und am darauffolgenden Tag zentrifugal infiziert (s. 2.3.5) (Infektion ausgehend von 1×10^5 Zellen). Nach der Infektion wurden die Zellen für 10min bei RT mit PFA/Saccharose (1:1) fixiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Nach der Fixierung erfolgte das Blocken. Hierzu wurden die Deckgläschen aus der 24well-Zellkulturplatte entfernt, die Flüssigkeit abgetropft und 50µl der Blocklösung auf die Zellen gegeben und für 30min bis 60min bei RT inkubiert. Zur anschließenden Färbung mit dem Primär-Ak wurde dieser in Blocklösung verdünnt, auf die Zellen gegeben und diese in einer feuchten Kammer bei RT üN inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen fünfmal für 5min mit PBS gewaschen und danach der Sekundär-Ak, verdünnt in Blockierungslösung, mit dem jeweiligen Fluorochrom auf die Zellen gegeben und für 1h bei RT im Dunkeln inkubiert. Nochmals wurden die Zellen 5×5 min mit PBS gewaschen, für 5min mit Hoechst 33342 (1:5000 verdünnt in PBS) (invitrogen, Karlsruhe) gegengefärbt und ein letztes Mal 3×5 min mit PBS gewaschen. Um die Deckgläschen auf Objektträgern zu fixieren, wurden die Objektträger mit Ethanol gesäubert und die Deckgläschen mit den Zellen nach unten auf einen Tropfen Mounting-Medium (Sigma-Aldrich, Schnellendorf) gelegt und getrocknet. Schließlich wurde das Deckgläschen mit Nagellack luftdicht verschlossen und bei 4°C dunkel gelagert. Die Auswertung der Immunfluoreszenzen erfolgte mit dem *laser scanning* Mikroskop.

2.7 Tierexperimentelle Methoden

2.7.1 Verwendete Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden sowohl weibliche, als auch männliche Mäuse des Inzuchtstamms BALB/c mit dem Haplotyp H-2^d (K^d, D^d, L^d) verwendet, die an der zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Johannes Gutenberg-Universität Mainz unter SPF-Bedingungen (*specified pathogen free*) gezüchtet wurden. Alle tierexperimentellen Arbeiten erfolgten mit Genehmigung der Bezirksregierung Rheinhessen-Pfalz (Genehmigungsnummer 051-62 und G09-1-004).

2.7.2 Immunsuppression

Für alle Tierversuche wurden 8 bis 10 Wochen alte BALB/c-Mäuse verwendet. Diese wurden in einer Kleintierbestrahlungsanlage (Buchler, Braunschweig) mit zwei ^{137}Cs -Quellen mit einer Dosis von 7Gy subletal bestrahlt. Die Bestrahlungszeit wurde monatlich entsprechend der Halbwertszeit des ^{137}Cs angepasst. Die γ -Bestrahlung führt zu einer Aplasie des Knochenmarks durch Auslöschung hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen (Mutter *et al.*, 1988).

2.7.3 Intraplantare Infektion der BALB/c-Maus

Die zu verwendenden Viren wurden auf eine Viruskonzentration von jeweils 1×10^5 PFU in 25 μl PBS eingestellt und gekühlt. Davon wurden 50 μl injiziert, um sicher zu stellen, dass mindestens 1×10^5 PFU übertragen wurden, wobei die tatsächliche Infektionsdosis zwischen 1×10^5 und 2×10^5 PFU pro Tier liegt. Das Virus wurde den Mäusen mit einer 1ml-Spritze und Kanülen der Dicke 0,4 \times 12mm intraplantar (i.f.) in die Hinterpfote injiziert. In immunsupprimierten Tieren waren nach einer Woche deutliche Hämorrhagien und lokale Schwellungen dieser Hinterpfote sichtbar.

2.7.4 i.v. und i.p. Injektion von DT

Den mit mCMV_ Δ IE2DTR bzw. mCMV-IE1L176A_ Δ IE2DTR akut infizierten BALB/c-Mäusen wurde DT in einer Konzentration von 5 \times 10ng/g Körpergewicht i. v. injiziert, den latent infizierten Tieren 4 \times 10ng DT/g Maus i.v und 4 \times 30ng DT/g Maus i. p.. Die Injektion erfolgte in einem Abstand von jeweils 16h in einem Volumen von ca. 500 μl (verdünnt in PBS) über die laterale Schwanzvene bzw. i.p..

2.7.5 Organentnahme und Probenkonservierung

Nach CO₂-Betäubung und anschließender zervikaler Dislokation und Desinfektion der Tiere wurde die Pfote isoliert und nach Eröffnung des Bauchraums und Halsbereichs Lunge, Leber, Milz und Speicheldrüse entnommen und je nach Fragestellung weiter behandelt. Für die anschließende Bestimmung der viralen Genome und Transkripte, sowie für die Organitration wurden die Organe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C aufbewahrt. Für eine histologische Färbung der Leber wurde diese üN in Formalinlösung (s. 2.5.1) inkubiert.

2.7.6 Experimentelle Knochenmarktransplantation und mCMV-Infektion

2.7.6.1 Isolierung von Knochenmarkszellen

Als KMZ-Spender für die KMT dienten weibliche BALB/c-Mäuse. Nach Betäubung mit CO₂ und zervikaler Dislokation wurden die Spender zur Desinfektion in 70% (v/v) EtOH getaucht und anschließend die Hinterbeine beidseitig entfernt. Dabei wurde der Femurknochen von der Hüftgelenkpfanne abgetrennt, Femur und Tibia freipräpariert und in PBS-Lösung mit 2% (v/v) FCS gesammelt, um ein Austrocknen zu verhindern. Zum Spülen der Markhöhlen der Knochen wurden die Epiphysen abgeschnitten und die Knochen mit Hilfe einer 0,4×12mm-Kanüle mit PBS mit 2% (v/v) FCS gespült und das Knochenmark aufgefangen. Das gesammelte Knochenmark wurde zweimal mit PBS gewaschen (Zentrifugation für 10min bei 300×g; Megafuge 2.0, Rotor: 8160) und anschließend über ein Zellnylonsieb (100µm) filtriert. Nach der Zellzählung (die erwartete Zellzahl pro Maus, jeweils zwei Tibien und Femuren, beträgt 1×10^7 bis 3×10^7) wurden die KMZ für die folgende Transplantation auf eine definierte Zellzahl von 1×10^7 KMZ/ml in PBS eingestellt.

2.7.6.2 Bestrahlung der Rezipienten, KMT und Infektion

Zur Immunsuppression wurden die Rezipientenmäuse mit einer Dosis von 6,5Gy bestrahlt (s. 2.7.2). Nach der Aufarbeitung der KMZ (s. 2.7.6.1) wurden diese den Mäusen mit einer Konzentration von 5×10^6 KMZ in 500µl PBS i. v. in die laterale Schwanzvene injiziert. Direkt nach der Knochenmarkgabe wurden die Mäuse mit mCMV i.f. infiziert (s. 2.7.3).

Kapitel 3

Ergebnisse

Die Lunge stellt einen Hauptort der mCMV-Pathogenese, Latenz und Reaktivierung dar. Die akute, produktive Infektion wird, wie im BALB/c Maus-Modell für die mCMV-Infektion gezeigt werden konnte, nach experimenteller KMT durch infiltrierende antivirale CD8 T-Zellen terminiert, die eine disseminierte interstitielle Pneumonie verhindern (Podlech *et al.*, 2000). Das virale Genom verbleibt im Lungengewebe in einem nicht replikativen Zustand (Kurz *et al.*, 1997), der als molekulare Latenz bezeichnet wird (Roizman and Sears, 1987) erhalten, ist jedoch nicht transkriptionell inaktiv (Kurz *et al.*, 1999; Kurz und Reddehase, 1999; Grzimek *et al.*, 2001). Während der viralen Latenz sind *ie1* und *ie2* zufällig *desilenced*, wodurch *IE1*- und *IE2*-Transkripte zu jedem Zeitpunkt in der Lunge in einer geringen Frequenz nachgewiesen werden können (Grzimek *et al.*, 2001). Für den essentiellen Transaktivator *IE3* (Angulo *et al.*, 2000) sind keine gespleißten Transkripte nachzuweisen (Kurz *et al.*, 1999), es werden folglich weder E-Proteine, noch infektiöses Virus gebildet.

Bisher konnte die transkriptionelle Aktivität des MIE-Lokus lediglich zu einem bestimmten Zeitpunkt während der Latenz in der Lunge beobachtet werden (*point prevalence*). Durch die Anreicherung aktivierter *IE1*-spezifischer CD8 T-Zellen während der Latenz liegt jedoch die Vermutung nahe, dass es wesentlich häufiger zu einer Reaktivierung des MIE-Lokus kommt (*period prevalence*). Um die Frequenz dieser Reaktivierungsereignisse zu untersuchen, sollte in dieser Arbeit eine Methode entwickelt werden, die es erlaubt, Virus infizierte Zellen sowohl in der akuten, als auch in der latenten Phase konditional und selektiv auszulöschen. Dazu wurde hier erstmals ein rekombinantes *death-tagged* mCMV generiert, in dem das Gen für den simian DTR unter Kontrolle des *ie2*-Promotors steht und die Expression des *ie2*-Gens durch Expression des DTR ersetzt wurde. Ist der *ie2*-Promotor aktiv, wird der DTR an der Oberfläche exprimiert. Durch die Differenz der DNA-Load aus Lungenstücken DT-behandelter und DT-unbehandelter Mäuse kann somit abgeschätzt werden, wie viele Reaktivierungsereignisse in einem bestimmten Zeitraum stattgefunden haben.

Da sich das applizierte DT über einen längeren Zeitraum im Zellkulturmedium von MEF bzw. im Körper der Maus befindet, führt eine DT-Behandlung von akut infizierten Zellen in Zellkultur, sowie eine DT-Behandlung von akut oder latent infizierten Tieren, zu einer Zelltyp unabhängigen, selektiven Auslöschung von Zellen, in denen der MIE-Lokus transkriptionell aktiv ist. Durch den Vergleich von infizierten DT-behandelten MEF mit DT-unbehandelten MEF sollte gezeigt werden, dass das Virus in Anwesenheit von DT nicht mehr replizieren kann. Die hemmende Wirkung von DT auf die Virusreplikation sollte ebenfalls in akut infizierten Tieren verifiziert werden, sowie die Abnahme an latentem viralem Genom von DT-behandelten latent infizierten Tieren in einem bestimmten Zeitraum im Vergleich zu DT-unbehandelten latent infizierten Tieren.

3.1 Zwei-Schritt BAC-Mutagenese zur Insertion des simian *DTR*-Gens in das mCMV-Genom

Die Insertion des simian *DTR*-Gens in das mCMV-Genom erfolgte mit Hilfe der Zwei-Schritt BAC-Mutagenese nach Messerle *et al.* (1997) und Wagner *et al.* (1999). Diese Methode ermöglicht eine Basen-genaue Insertion eines Fremdgens durch homologe Rekombination ohne verbleibende Vektorsequenzen oder Selektionsmarker, welche die Viruseigenschaften negativ beeinflussen könnten. Hierzu wurde ein *shuttle*-Vektor benötigt, der die Sequenz des zu insertierenden *DTR*-Gens und den die Insertionsstelle flankierenden viralen Homologiebereich aus dem mCMV-Genom bereitstellt. Nach der Transformation von *E. coli* DH10B, die bereits das zu mutierende mCMV-BAC-Plasmid enthielten, mit dem klonierten *shuttle*-Plasmid, entstand über homologe Rekombination und anschließende Selektionsschritte das rekombinante mCMV-BAC-Plasmid.

3.1.1 Herstellung des *shuttle*-Plasmids pST76K_SSR_ΔIE2DTR

Für die Herstellung des benötigten *shuttle*-Plasmids pST76K_SSR_ΔIE2DTR, welches das insertierte *DTR*-Gen enthält, diente das Plasmid pST76K_SSR (Pósfai *et al.*, 1997; Borst *et al.*, 2004) (s. Abb. 3.1) als Ursprungs-*shuttle*-Plasmid. Dieser Vektor besitzt ein Temperatursensitives Replikon, das eine Replikation bei einer Temperatur von 30°C erlaubt. Zudem trägt es die Gene für die *RecA*-Rekombinase, welche die Mutagenese in *RecA*-negativen *E. coli*-Stämmen wie DH10B ermöglicht, *nptII* (Neomycin-Phosphotransferase, *Kan^{Res}*), sowie für *SacB*, das Exoenzym Levan-Saccharase aus *Bacillus subtilis* (Blomfield *et al.*, 1991; Borst *et al.*, 2004).

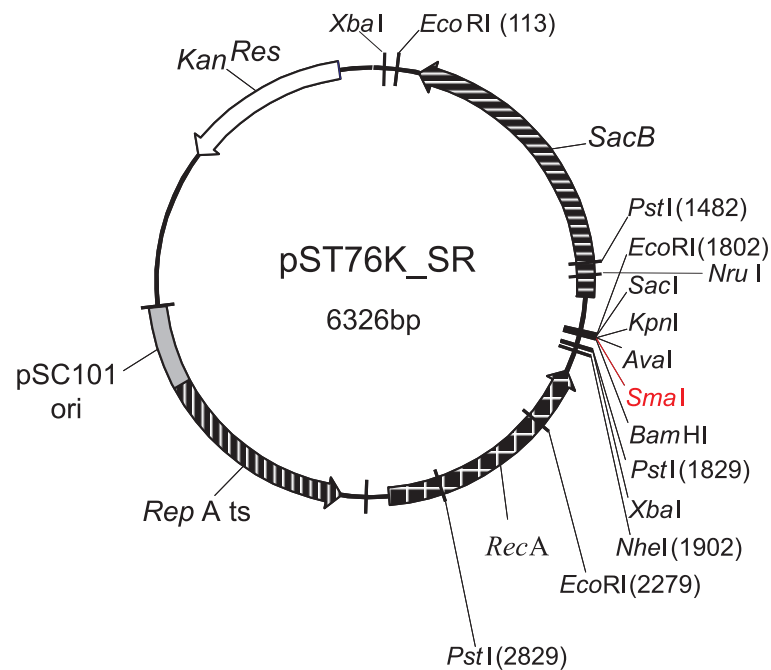


Abb. 3.1: Schematische Darstellung des Ursprungs-*shuttle*-Plasmids pST76K_SR.

Das *low copy*-Plasmid trägt den Temperatur-sensitiven Replikationsursprung pSC101 ori. Es enthält die während der Mutagenese benötigten Gene *RecA* (Rekombinase), *nptII* (*Kan^{Res}*), *RepA ts* (Replikations-Initiator-Protein mit Punktmutation, das bei Temperaturen $\geq 37^{\circ}\text{C}$ durch Fehlfaltung inaktiviert wird), sowie *SacB* (Levan-Saccharase aus *B. subtilis*). Die singuläre Schnittstelle des Restriktionsenzym *SmaI*, welche zur späteren Insertion des *DTR*-Gens diente, ist rot dargestellt (verändert nach Simon C., 2005; Dissertation).

Zur Generierung des *shuttle*-Plasmids pST76K_SR_ΔIE2DTR (s. Anhang A.1-B) wurde in einem ersten Schritt die *ie1/3-ie2*-Region des MIE-Lokus (Position n 181.415 bis n 186.972; Rawlinson *et al.*, 1996) in das Ursprungs-*shuttle*-Plasmid pST76K_SR kloniert. Dabei konnte auf das Plasmid pUCAMB25 zurückgegriffen werden, das fast die komplette MIE-Region des mCMV beinhaltet (Grzimek *et al.*, 2001). Bei dieser Klonierungsstrategie musste darauf geachtet werden, dass sich zu beiden Seiten des späteren Integrationsortes des *DTR*-Gens in das mCMV-Genom gleich große virale Homologiesequenzen befinden (Smith, G. R., 1988). Zur Klonierung des Zwischenkonstrukts pST76K_SRIe1/3-ie2 (s. Anhang A.1-A) wurde die MIE-PEEP-Region mit dem Restriktionsenzym *PmlI* (glatte Enden, *blunt end*) aus dem Plasmid pUCAMB herausgeschnitten. Um das 5,557kbp große *PmlI*-Fragment in das Ursprungs-*shuttle*-Plasmid klonieren zu können, wurde das Ursprungs-*shuttle*-Plasmid mit *SmaI blunt* geschnitten. Der linearisierte Vektor wurde dephosphoryliert und nach der *blunt-end*-Ligation (s. 2.4.12) mit dem Insert in *E. coli* DH10B transformiert (s. 2.4.3.2) und anschließend auf LB-Platten mit Kan bei 30°C selektioniert. Aus gewachsenen Kan-resistenten Klonen wurde die DNA isoliert und durch Restriktionsenzymverdau mit *XbaI* die Insertion der MIE-PEEP-Region in das Ursprungs-*shuttle*-Plasmid verifiziert (s. Abb. 3.2-A). Der Vektor alleine ergibt nach dem *XbaI*-Restriktionsenzymverdau Fragmentgrößen von 1,8kbp und 4,5kbp. Ist das *ie1/3-ie2*-Fragment

im Zwischenkonstrukt enthalten, entstehen nach dem Restriktionsenzymverdau mit *Xba*I Fragmente mit 4,5kbp und 7,3kbp Größe. Da es sich hierbei um eine *blunt-end* Klonierung handelt, wurde die Orientierung des *ie1/ie3-ie2*-Fragments durch einen Restriktionsenzymverdau mit *Nru*I (s. Abb. 3.2-B) ermittelt. Liegt die *ie1/3-ie2* Genregion in gleicher Orientierung zum mCMV-Genom vor (s. Abb. 3.3-B), entstehen durch Restriktionsenzymverdau mit *Nru*I Fragmente von 1,7kbp und 10,1kbp Größe. Würde dieselbe Region in entgegengesetzter Orientierung im Zwischenkonstrukt pST76K-SR*ie1/3-ie2* vorliegen, entstünden Fragmente mit einer Größe von 7,5kbp und 4,3kbp. Der *Nru*I-Restriktionsenzymverdau des Ursprungs-*shuttle*-Plasmids ergab ein 6,3kbp großes DNA-Fragment.

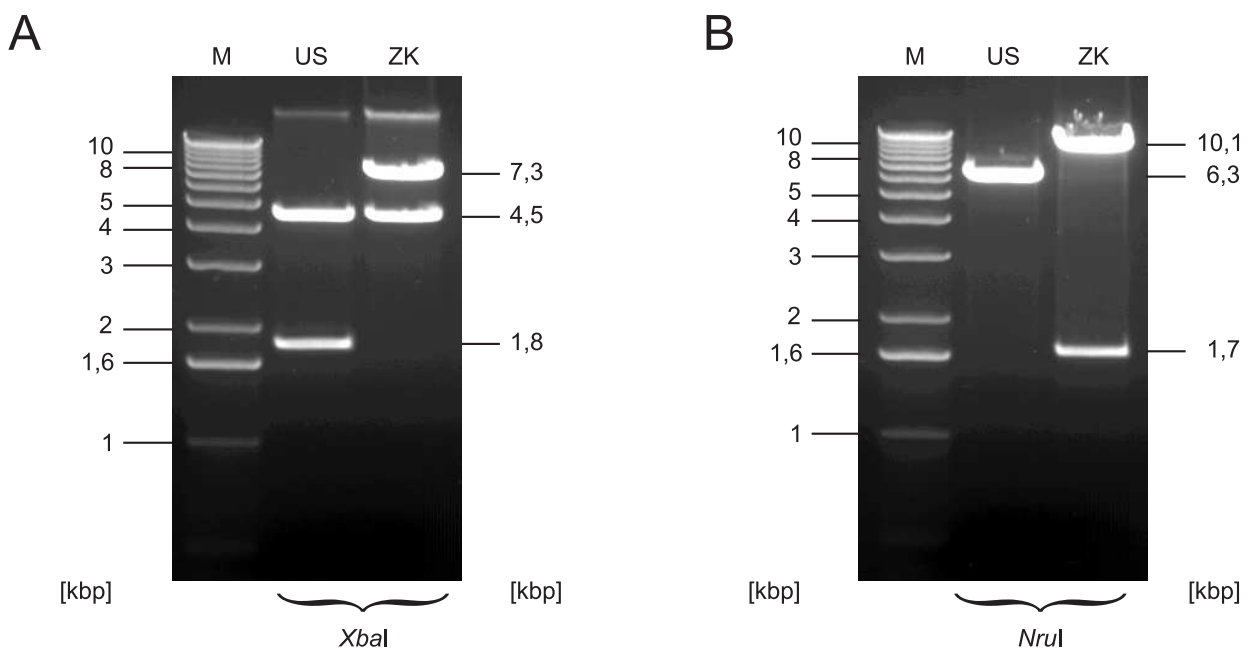


Abb. 3.2: Gelelektrophoretische Auftrennung des generierten Zwischenkonstrukts pST76K_SR*ie1/3-ie2* nach Restriktionsenzymverdau. Gelelektrophoretische Auftrennung des Zwischenkonstrukts nach Restriktionsenzymverdau mit *Xba*I und *Nru*I. A) Nach dem Restriktionsenzymverdau mit *Xba*I ergeben sich Fragmente von 4,5kbp und 7,3kbp bei inserierter *ie1/3-ie2*-Region. Ein leeres Ursprungs-*shuttle*-Plasmid ergibt für den *Xba*I-Verdau Banden bei 1,8kbp und 4,5kbp. B) Für den *Nru*I-Restriktionsenzymverdau ergeben sich Fragmente mit der Größe 1,7kbp und 10,1kbp bei vorhandener *ie1/3-ie2*-Region. Der Vektor ohne Insert ergibt ein lineares Fragment bei 6,3kbp. Spur M, 1kbp DNA-Längenstandard; US, Ursprungs-*shuttle*-Plasmid pST76K_SR; ZK, Zwischenkonstrukt pST76K_SR*ie1/3-ie2*.

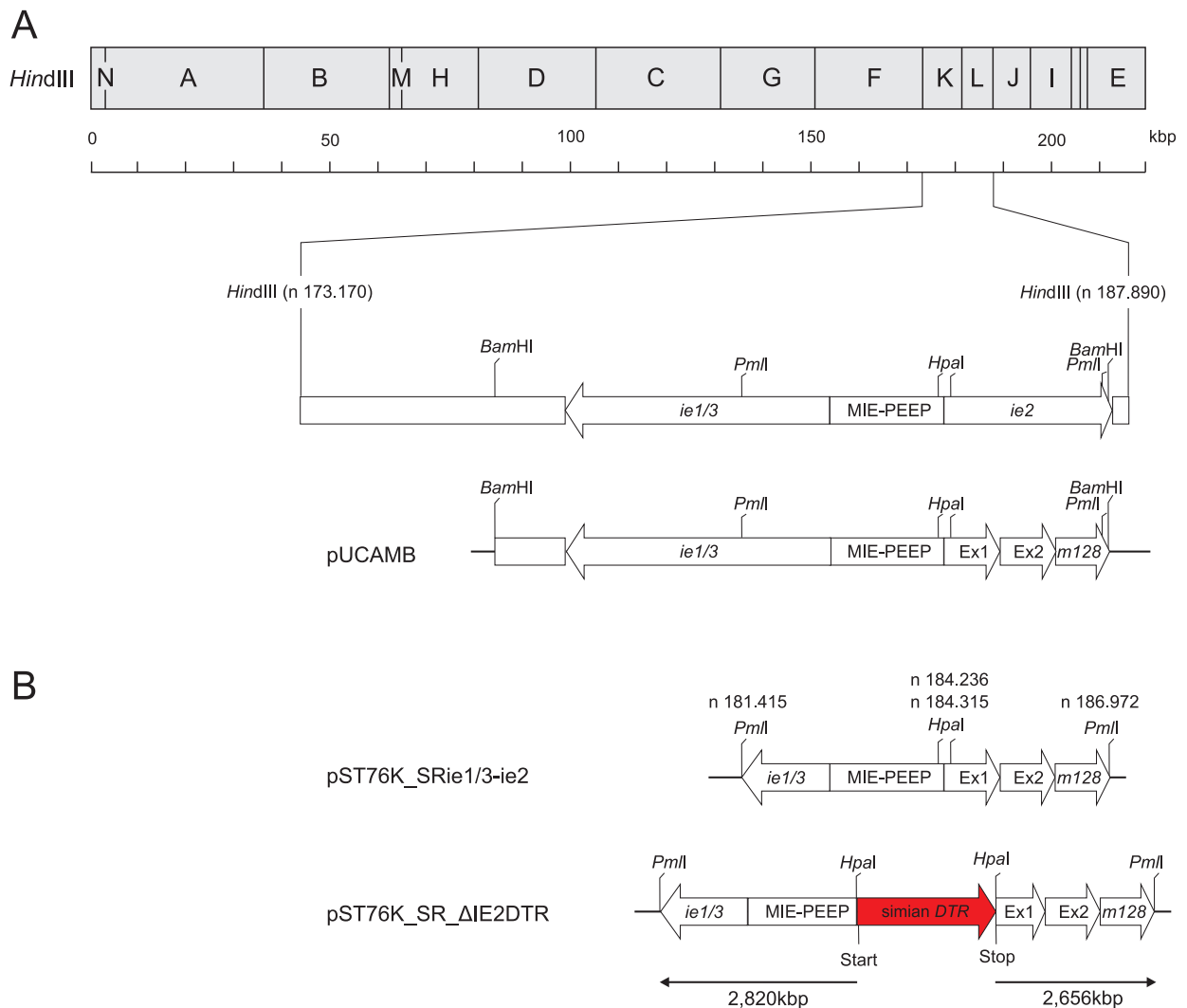


Abb. 3.3: Konstruktion des *shuttle*-Plasmids pST76K_SR_ΔIE2DTR. A) Physikalische *Hind*III-Karte des mCMV-WT.BAC-Genoms mit Vergrößerung des K- und L-Fragments. Die Nukleotidpositionen (n) beziehen sich auf die mCMV-Sequenz nach Rawlinson *et al.* (1996). Gezeigt ist das Basiskonstrukt pUCAMB mit der *ie1/3-ie2*-Region. B) Die *Pml*I-Restriktionsschnittstellen dienen zur Klonierung des Zwischenkonstrukts pST76K_SRie1/3-*ie2* mit der zur homologen Rekombination verwendeten 5,557kbp großen mCMV-WT.BAC-Sequenz der MIE-Region. Die für die Insertion des *DTR*-Gens (rot) verwendeten *Hpa*I-Restriktionsschnittstellen sind ebenfalls eingezeichnet. Die Orientierung des *DTR*-Gens im *shuttle*-Plasmid pST76K_SR_ΔIE2DTR ist gleich dem *ie2*-Gen und ist durch die Pfeilrichtung angegeben.

Das erfolgreich klonierte Zwischenkonstrukt pST76K_SRie1/3-*ie2* diente als Vektor zur Generierung des *shuttle*-Plasmids pST76K_SR_ΔIE2DTR. Dazu wurde zunächst das Zwischenkonstrukt pST76K_SRie1/3-*ie2* mit *Hpa*I geschnitten. Durch das Vorhandensein zweier *Hpa*I-Schnittstellen in der MIE-PEEP-Region (Position n 184.236 bis n 184.315, Positionsangabe nach Rawlinson *et al.*, 1996) wurde ein 79bp großes DNA-Fragment, welches die komplette *ie2*-Promotorsequenz und einen Teil der *ie2*-Exon1-Sequenz enthält, deletiert. Die zu insertierende *DTR*-Sequenz wurde aus dem Plasmid pBS_DTR_SV40pA mittels spezieller *touch-down*-PCR

amplifiziert. Die *touch-down*-PCR zeichnet sich im Gegensatz zum klassischen PCR-Protokoll (s. 2.4.13) durch veränderte *annealing*-Temperaturen aus, welche eine höhere Amplifikationsausbeute versprechen. In den ersten 18 Zyklen wird die *annealing*-Temperatur, beginnend bei 62°C, pro Zyklus um 1°C erniedrigt. 12 weitere Zyklen schließen sich mit einer *annealing*-Temperatur von 45°C an. Durch die Amplifikation mit den *Primern* PrimerDTRforw und PrimerDTRrev2 wurde eine Sequenz von 678bp amplifiziert, die das *DTR*-Gen, den *ie2*-Promotor und flankierende *HpaI*-Schnittstellen enthält (s. Abb. 3.4). Das PCR-Produkt wurde mit *HpaI* geschnitten und in die Ligation mit dem zuvor *HpaI*-restringierten Vektor pST76K_SRie1/3-*ie2* eingesetzt. Nach der Ligation wurde der Ansatz in *E. coli* DH10B transformiert und die Bakterien auf LB-Platten mit Kan bei 30°C üN selektioniert. Von den gewachsenen Kan-resistenten Klonen wurde die DNA isoliert und sowohl die Insertion, als auch die Orientierung des *DTR*-Gens in der MIE-PEEP-Region durch Restriktionsenzymverdau bestimmt (s. Abb. 3.5).

PrimerDTRforw

Start

gga gtaaac catataaaagctgctccccatgccattcga acc atg aagctgctgccgctcgggtgctg

HpaI *ie2*-Promotor DTR-homologe Sequenz (30bp)

PrimerDTRrev2

Stop

gga gtaaac tca gtgggaattagtcatgcccaactcactttctctcgtttccacatcataaccacctc

HpaI DTR-homologe Sequenz (59bp)

Abb. 3.4: Primer-Design zur Amplifizierung des DTR-Produkts aus pBS_DTR_SV40pA. Die *Primer* zur Amplifizierung des *DTR*-Gens enthalten Sequenzen, die homolog zum *DTR*-Gen sind. Zusätzlich enthalten sie an ihren 5'-Enden *HpaI*-Schnittstellen. Der Vorwärts-*Primer* enthält zudem die Sequenz der zuvor deletierten *ie2*-Promotorsequenz und der Rückwärts-*Primer* ein Stop-Codon unmittelbar vor der *HpaI*-Schnittstelle. Das durch die *touch-down*-PCR entstandenen Amplifikat hat eine Größe von 678bp.

3.1.2 Charakterisierung des *shuttle*-Plasmids

Nach der Generierung des *shuttle*-Plasmids pST76K_SR_ΔIE2DTR wurde durch Restriktionsenzymverdau mit *MluI* die Insertion des *DTR*-Gens im *shuttle*-Plasmid verifiziert (s. Abb. 3.5-A). Durch den *MluI*-Verdau entstanden ein 3,3kbp sowie ein 9,2kbp großes DNA-Fragment. Ohne die Insertion des *DTR*-Gens (vergl. Zwischenkonstrukt (ZK) pST76K_SRie1/3-*ie2*) entstanden zwei DNA-Fragmente mit einer Größe von 2,7kbp und 9,2kbp. Da das *DTR*-Gen über *blunt-end*-Ligierung in das *shuttle*-Plasmid integriert wurde, musste zusätzlich dessen Orientierung mit einem *BlnI*-Restriktionsenzymverdau bestimmt werden (s. Abb. 3.5-B). Liegt das

DTR-Gen in gleicher Orientierung wie das *ie2*-Gen vor, entsteht eine Doppelbande für die Fragmente mit 1,768kbp und 1,782kbp Größe und ein Fragment der Größe 8,9kbp. Es ist sehr wichtig, dass die Orientierung des *DTR*-Gens gleich der des *ie2*-Gens in der MIE-PEEP-Region ist, da das *DTR*-Gen sonst nicht unter Kontrolle des *ie2*-Promotors liegt, nicht exprimiert wird und somit nicht funktionell ist.

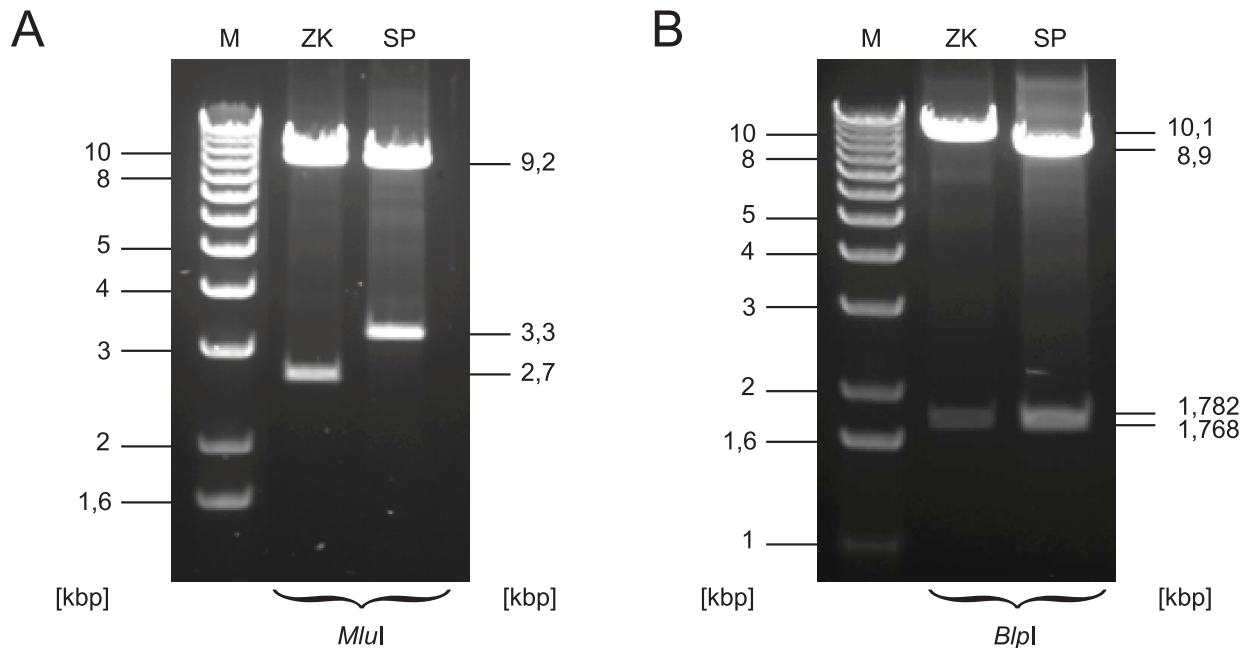


Abb. 3.5: Gelelektrophoretische Auftrennung des generierten *shuttle*-Plasmids pST76K_SR_ΔIE2DTR nach Restriktionsenzymverdau. Gelelektrophoretische Auftrennung des *shuttle*-Plasmids nach Restriktionsenzymverdau mit *MluI* und *BlnI*. A) Der *MluI*-Restriktionsenzymverdau des *shuttle*-Plasmids (SP) ergibt zwei Fragmente bei 3,3kbp und 9,2kbp. Der Verdau des Zwischenkonstrukts (ZK) ergab Fragmente der Größe 2,7kbp und 9,2kbp. B) Der *BlnI*-Restriktionsenzymverdau ergab für das SP Fragmente bei 1,768/1,782kbp (Doppelbande) und 8,9kbp, für das ZK Fragmente bei 10,1kbp und 1,782kbp. Der *BlnI*-Restriktionsenzymverdau bestätigt die richtige Orientierung des *DTR*-Gens hinter dem *ie2*-Promotor. Spur M, 1kbp DNA-Längenstandard; ZK, Zwischenkonstrukt pST76K_SRie1/3-*ie2*; SP, *shuttle*-Plasmid pST76K_SR_ΔIE2DTR.

Die Orientierung des *DTR*-Gens wurde zusätzlich durch eine PCR mit den *Primern* *ie2DTR_1* und *ie2DTR_3* verifiziert (s. Abb. 3.6). Liegt das *DTR*-Gen in gleicher Orientierung wie das *ie2*-Gen vor, wird ein 882bp großes PCR-Produkt amplifiziert, liegt es in entgegengesetzter Richtung vor, entsteht kein PCR-Produkt. Von dem *DTR*-positiven Klon mit richtiger Orientierung wurde das *DTR*-PCR-Produkt sequenziert. Es wurden keine Punktmutationen in der *DTR*-Sequenz festgestellt. Das finale *shuttle*-Plasmid pST76K_SR_ΔIE2DTR wurde anschließend zur Herstellung rekombinanter mCMV-BAC-Plasmide mittels Zwei-Schritt BAC-Rekombination (s. 2.4.16.1) verwendet.

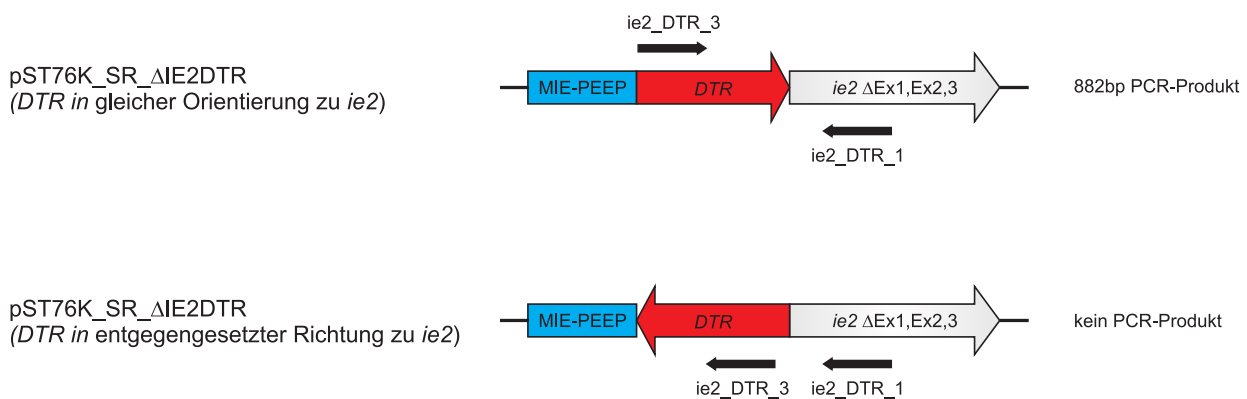


Abb. 3.6: Schematische Darstellung der PCR zur Ermittlung der *DTR*-Orientierung im *shuttle*-Plasmid nach *blunt-end*-Ligierung. Schema eines Ausschnitts der Gen-Organisation im Bereich des *MIE*-Lokus nach Insertion des *DTR*-Gens. Liegt das *DTR*-Gen (rot) in gleicher Orientierung zum *ie2*-Gen (grau) vor, entsteht durch die Bindung des Primers *ie2_DTR_1* im *DTR*-Gen und des Primers *ie2_DTR_3* im *ie2*-Gen ein 882bp großes PCR-Produkt. Liegt das *DTR*-Gen in entgegengesetzter Richtung zum *ie2*-Gen vor, entsteht kein PCR-Produkt. Die Positionsangaben der *Primer* sind der Tab. 2.11 zu entnehmen.

Schlussfolgerung:

Die Klonierung des für die homologe Rekombination benötigten *shuttle*-Plasmids pST76K_SR_ΔIE2DTR konnte erfolgreich realisiert werden. Das *DTR*-Gen befindet sich in gleicher Orientierung zum *ie2*-Gen unter Kontrolle des *ie2*-Promotors.

3.2 Herstellung und Charakterisierung rekombinanter mCMV-BAC-DTR-Plasmide

Das erfolgreich hergestellte und charakterisierte *shuttle*-Plasmid pST76K_SR_ΔIE2DTR konnte zur Herstellung der rekombinanten mCMV-BAC-Plasmide durch homologe Rekombination im Zwei-Schritt Rekombinationsverfahren (s. 2.4.16.1) verwendet werden. Als Ausgangskonstrukte dienten dabei das mCMV-BAC-WT (Wagner *et al.*, 1999) bzw. die Funktionsverlustmutante mCMV-BAC-IE1L176A, die einen AS-Austausch im IE1-Peptid enthält (Simon *et al.*, 2006a).

3.2.1 Herstellung rekombinanter mCMV-BAC-DTR-Plasmide

1. mCMV-BAC_ΔIE2DTR

Nach der Transformation elektrokompenter *E. coli* DH10B, die das zu mutierende mCMV-BAC-WT-Plasmid enthalten, mit dem *shuttle*-Plasmid pST76K_SR_ΔIE2DTR, erfolgte die Rekombination und die Bildung von Co-Integraten aus dem BAC-Plasmid und dem *shuttle*-Plasmid über eine der beiden flankierenden viralen Homologien. Eine Inkubation bei 43°C selektiert positiv auf Klone, die Co-Integrate enthalten. Klone, bei denen das *shuttle*-Plasmid

nicht integriert wurde, können bei dieser Temperatur nicht replizieren. Durch erneute homologe Rekombination zwischen zwei identischen flankierenden viralen Sequenzen erfolgte die Auflösung der Co-Integrate. Geschieht dies über die gleiche Homologie wie bei der ersten Rekombination, so entsteht wieder ein mCMV-BAC-WT-Plasmid. Erfolgt die Rekombination dagegen über die andere der beiden Homologien, so entsteht ein rekombinantes mCMV-BAC-Plasmid, welches das *DTR*-Gen trägt. Durch die anschließende Kultivierung der Bakterien auf LB-Agarplatten mit Saccharose wurden aufgelöste Co-Integrate angereichert, da Bakterien mit nicht aufgelösten Co-Integraten die von *SacB* kodierte Levan-Saccharase exprimieren und somit Saccharose zur toxischen Levan-Saccharose umsetzen (Blomfield *et al.*, 1991). Hierdurch konnte die Ausbeute für erfolgreich mutierte mCMV-BAC-Plasmide von 2,5% auf 50% (Wagner *et al.*, 1999) erhöht werden. Die Identifizierung erfolgreich mutierter **mCMV-BAC_ΔIE2DTR**-Plasmide wurde durch Restriktionsenzymverdau (s. Abb. 3.7-A) und Sequenzierung (s. Abb. 3.8) bestätigt. Die isolierte BAC-DNA beinhaltet die Sequenz für den simian DTR unter Kontrolle des *ie2*-Promotors.

2. mCMV-BAC-IE1L176A_ΔIE2DTR

Mit Hilfe der gleichen Methode wurde das **mCMV-BAC-IE1L176A_ΔIE2DTR**-Plasmid hergestellt. Hierzu wurden elektrokompente *E. coli* DH10B verwendet, die das BAC-Plasmid mit der Punktmutation im IE1-Peptid (L176A) enthalten (mCMV-BAC-IE1L176A). Das so hergestellte mCMV-BAC-IE1L176A_ΔIE2DTR enthält nun zusätzlich zur *DTR*-Sequenz eine Punktmutation, die die Kontrolle des Virus durch IE1-spezifische CD8 T-Zellen verhindert (Simon *et al.*, 2006a). Das Vorhandensein des *DTR*-Gens und die IE1L176A-Punktmutation wurden ebenfalls durch einen Restriktionsenzymverdau (s. 3.2.2) (s. Abb. 3.7-B) und eine Sequenzierung (s. 3.2.3) (s. Abb. 3.9) überprüft.

3.2.2 Restriktionsenzymverdau der rekombinanten mCMV-BAC-DTR-Plasmide

Die isolierte BAC-Plasmid-DNA wurde im Folgenden auf die vollständige Integrität des BAC-Plasmids und die Insertion des *DTR*-Gens überprüft. Es befinden sich Sequenzwiederholungen von 553bp Länge im BAC-Plasmid, welche die BAC-Vektorsequenz flankieren und zur Entfernung der bakteriellen Sequenz (BAC-Vektor) nach der Virusrekonstitution dienen. Aufgrund dieser Sequenzwiederholungen kann es jedoch in *RecA*-negativen *E. coli*-Stämmen auch spontan zu Rekombinationsereignissen zwischen den internen viralen Sequenzwiederholungen sowie zwischen viralen und bakteriellen Sequenzen kommen, was zum Verlust des mCMV-Genoms aus dem BAC-Plasmid führt. Durch einen Restriktionsenzymverdau der isolierten BAC-Plasmid-DNA mit *EcoRI*, *HindIII* und *XbaI* konnte sowohl die Integrität des BAC-Plasmids, als auch die Insertion

des *DTR*-Gens bestätigt werden. In Abb. 3.7-A ist die Auftrennung der BAC-DNA von mCMV-BAC_ΔIE2DTR und dem mCMV-BAC-WT zu sehen. Es zeigt sich, dass nach dem *EcoRI*- und *XbaI*-Verdau kein Unterschied des mutierten mCMV-BAC-Genoms zum mCMV-BAC-WT vorliegt. Durch die Insertion des *DTR*-Gens wird jedoch durch den *HindIII*-Restriktionsenzymverdau ein *shift* des in Abb. 3.7-A mit * markierten 7,161kbp großen Fragments um 587bp zu einem 7,748kbp großen *HindIII*-Fragment sichtbar. Das *DTR*-Gen ist somit im mCMV-Genom enthalten.

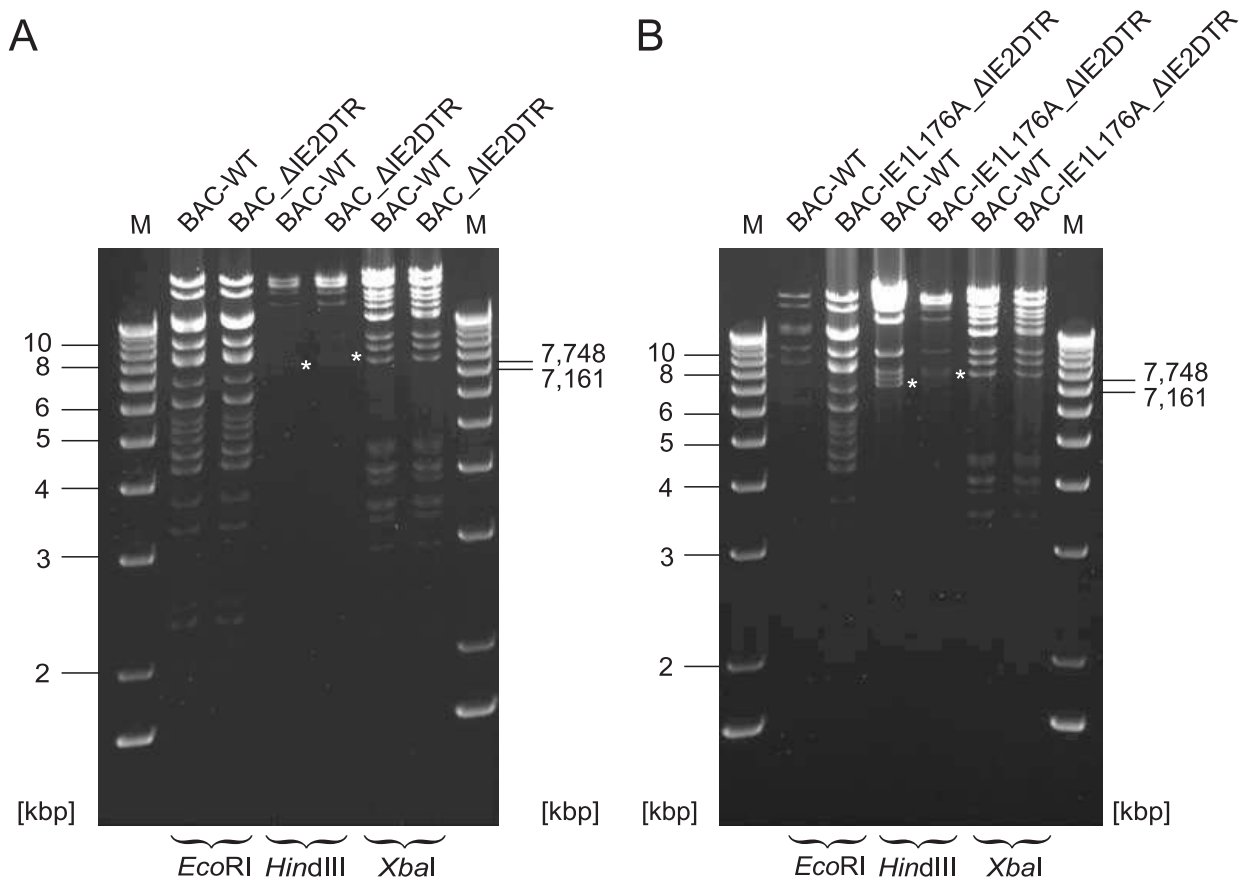


Abb. 3.7: Integrität des mCMV-BAC-Genoms nach homologer Rekombination in *E. coli*. Gelelektrophoretische Auftrennung der rekombinanten BAC-Plasmide nach Zwei-Schritt BAC-Rekombination zur Überprüfung der Integrität der BAC-Plasmide. BAC-DNA aus BAC-Maxipräparation wurde mit den Enzymen *EcoRI*, *HindIII* und *XbaI* restringiert und in einem 0,7%-igen TBE-Agarosegel aufgetrennt. Beide Klone A) mCMV-BAC_ΔIE2DTR und B) mCMV-BAC-IE1L176A_ΔIE2DTR zeigen das für den mCMV-BAC-WT typische Genomfragment-Muster für alle drei Restriktionsenzyme. Sowohl in A) als auch in B) ist beim *HindIII*-Restriktionsenzymverdau ein *shift* des 7,161kbp großen DNA-Fragments auf 7,748kbp Größe zu beobachten (hier nur schwach erkennbar, deshalb mit * markiert), was auf die Insertion des *DTR*-Gens mit 587bp zurückzuführen ist. Der *shift* des 12,662kbp Fragments zu einem 13,249kbp großen DNA-Fragment nach einem *XbaI*-Verdau, sowohl in A) als auch in B) ist hier nicht zu erkennen. Spur M, 1kbp DNA-Längenstandard.

Das rekombinante BAC-Plasmid mCMV-BAC-IE1L176A_ΔIE2DTR wurde ebenfalls einem Restriktionsenzymverdau unterzogen und die Integrität des BAC-Plasmids sowie die Insertion des *DTR*-Gens wurden überprüft (s. Abb. 3.7-B). Es zeigten sich auch hier keinerlei Veränderungen im typischen Genomfragment-Muster nach dem *EcoRI*- und dem *XbaI*-Restriktionsenzymverdau im Vergleich zum mCMV-BAC-WT. Nach dem Restriktionsenzymverdau mit *HindIII* ist wie bei mCMV-BAC_ΔIE2DTR ein *shift* der in Abb. 3.7-B mit * gekennzeichneten Bande um 587bp von 7,161kbp auf 7,748kbp zu erkennen.

3.2.3 Sequenzanalyse der rekombinanten BAC-Plasmide mCMV-BAC_ΔIE2DTR und mCMV-BAC-IE1L176A_ΔIE2DTR

Die Insertion des *DTR*-Gens und das Vorhandensein des vollständigen *ie2*-Promotors wurde zusätzlich durch eine Sequenzanalyse überprüft. Das PCR-Fragment, das später in die Sequenzierung eingesetzt wurde, musste zuvor aus der BAC-DNA der jeweiligen Rekombinanten amplifiziert werden. Dabei diente das *Primer*-Paar *ie2_DTR_1* und *ie2_DTR_3* (s. Tab. 2.11) zur Amplifizierung eines 882bp langen PCR-Fragments, welches die entsprechende DNA-Sequenz des *DTR*-Gens und den *ie2*-Promotor enthielt. Der sequenzierte Abschnitt, der den Übergang des wieder vollständig hergestellten *ie2*-Promotorbereichs (Nukleotid n 184.241-184.269 nach Rawlinson *et al.*, 1996) und des *DTR*-Gens mit seinem Start-Codon darstellt, ist in Abb. 3.8 gezeigt. Im Anhang A.2 sind die komplette *DTR*-Sequenz und die Sequenzen des umliegenden *ie2*-Gens zu finden.

```

      HpaI
ggcggagtta accatataaa agctgctccc catgccattc gaaccatgaa gctgctgccg
                                     START
                                     M  K  L  L  P
>.....MIE-PEEP.....>>
>>.....ie2-Promotor.....>>
                                     >>.....DTR.....>

```

Abb. 3.8: Ausschnitt der Sequenzierung von mCMV-BAC_ΔIE2DTR. Gezeigt ist ein Ausschnitt der Sequenzierung des Übergangs der *ie2*-Promotorsequenz zum inserierten *DTR*-Gen. Dieser Bereich der MIE-PEEP-Region wurde mit den Oligonukleotiden *ie2_DTR_1* und *ie2_DTR_3* sequenziert. Kompletter *ie2*-Promotorbereich (blau); *DTR*-Gen (rot) mit seinem Start-Codon (grün).

Die Identifizierung der gewünschten Punktmutation im Codon der C-terminalen MHC Klasse I-Anker-AS des IE1-Peptids im mCMV-BAC-IE1L176A_ΔIE2DTR konnte ausschließlich durch eine Sequenzierung erfolgen. Hierzu wurde mit dem *Primer*-Paar IE1ex2A und IE1ex4 (s. Tab. 2.11) ein 1.081bp langes PCR-Fragment mit mCMV-BAC-IE1L176A_ΔIE2DTR als *Template* amplifiziert, welches die DNA-Sequenz des IE1-Peptids beinhaltet. Die Punktmutation im IE1-Peptid im Vergleich zur authentischen IE1-Peptidsequenz im mCMV-BAC-WT ist in Abb. 3.9 zu sehen. Um die Fehlerrate der PCR zu minimieren, wurden alle PCR-Amplifizierungen mit einer *proof reading* DNA-Polymerase, die eine hohe Kopiergenauigkeit besitzt, durchgeführt.

mCMV-BAC-WT	<pre> n 181.020 tagatta gtgggcatga agtgtgggta n 181.046 atctaata caccgtact tcacacccat L N T P M F H P Y <<.....IE1-Peptid.....<< </pre>
mCMV-BAC-IE1L176A_ΔIE2DTR	<pre> n 181.020 tgcattag tgggcatgaa gtgtgggta n 181.046 acgtaata caccgtactt cacacccat A N T P M F H P Y <<.....IE1-Peptid.....<< </pre>

Abb. 3.9: Vergleich der Sequenzierung des C-terminalen Endes des immundominanten IE1-Peptids von mCMV-BAC-WT und mCMV-BAC-IE1L176A_ΔIE2DTR. Zur Überprüfung der Punktmutation im immundominanten IE1-Peptid, die zum AS-Austausch von Leucin (L) zu Alanin (A) in mCMV-BAC-IE1L176A_ΔIE2DTR führt, wurde der entsprechende Bereich mit den Oligonukleotiden IE1ex2A und IE1ex4 sequenziert. Das Ergebnis der Sequenzierung zeigt einen Ausschnitt ab Nukleotidposition n 181.020 (nach Rawlinson *et al.*, 1996). Die Punktmutation von 2bp am C-terminalen Ende, die zum Austausch der AS L zu A führt, ist mit einem Kasten umrandet.

In den rekombinanten BAC-Plasmiden mCMV-BAC_ΔIE2DTR und mCMV-BAC-IE1L176A_ΔIE2DTR sind die *ie2*-Promotorsequenzen vollständig im Genom vorhanden. Das *DTR*-Gen weist keine Mutationen auf, welche durch die Amplifikation des Gens aus dem Plasmid pBS_DTR_SV40pA hätten entstehen können, und enthält sein Start-Codon ATG und das Stop-Codon TGA. Die Mutante mCMV-BAC-IE1L176A_ΔIE2DTR enthält zudem die Punktmutation im IE1-Peptid von Leu₁₇₆ (L) zu Ala₁₇₆ (A) (n 181.020-181.022; Positionsangabe nach Rawlinson *et al.*, 1996).

Schlussfolgerung:

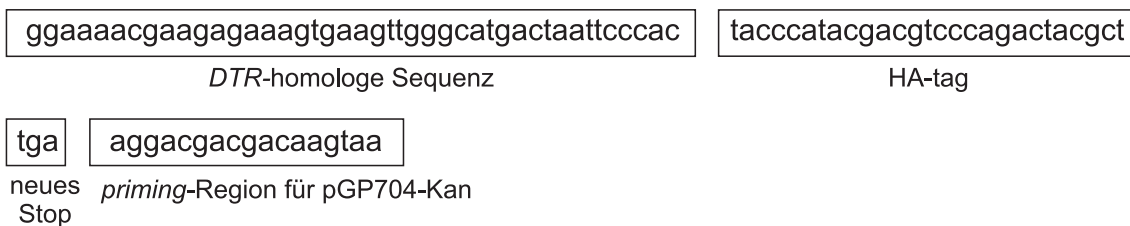
Die Integrität des mCMV-Genoms innerhalb der rekombinanten mCMV-BAC-Plasmide mCMV-BAC_ΔIE2DTR und mCMV-BAC-IE1L176A_ΔIE2DTR konnte mittels Restriktionsenzymverdau mehrfach bestätigt werden. Ebenso wurden die Nukleotid-genaue Insertion des *DTR*-Gens sowie das vollständige Vorhandensein des *ie2*-Promotors durch Sequenzanalyse verifiziert. Zusätzlich konnte der Basenpaaraustausch tc zu cg durch eine Sequenzanalyse bestätigt werden, die zum AS-Austausch von L nach A in der C-terminalen MHC Klasse I-Anker-AS des IE1-Peptids führt.

3.3 Ein-Schritt BAC-Mutagenese zur HA-Epitop-Markierung des DTR

Die HA-Epitop-Markierung des DTR ermöglicht die Aufklärung der intrazellulären Lokalisation des DTR durch Immunfluoreszenz bzw. den Nachweis des DTR-HA Proteins im Western Blot durch spezifische Ak, die gegen dieses Epitop gerichtet sind. Dazu musste am 3'-Ende des *DTR*-Gens das alte Stop-Codon durch ein neues Stop-Codon, unter gleichzeitiger Insertion der HA-Epitop-Sequenz, ersetzt werden. Hierfür wurde die Strategie der Ein-Schritt BAC-Mutagenese in *E. coli* SW105 verwendet (s. 2.4.16.2). Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Insertion eines linearen PCR-Fragments, das durch ein Doppel-*crossing-over* in das BAC-Plasmid integriert wird. Das lineare Amplifikat enthält neben der HA-Epitop-kodierenden Sequenz noch einen Selektionsmarker sowie die für die homologe Rekombination benötigten viralen Homologiebereiche. Der verwendete *E. coli*-Stamm enthält die für die homologe Rekombination benötigte FLP-Rekombinase, sowie das zuvor mittels Transformation (s. 2.4.3.3) eingebrachte BAC-Plasmid mCMV-BAC_ΔIE2DTR, in welches die HA-Epitop-Sequenz integriert werden soll. Durch die Ein-Schritt BAC-Mutagenese erfolgte die Rekombination zwischen einem zuvor generierten PCR-Amplifikat (Kan-Resistenz, FLP-Sequenzen, *DTR*-/*ie2*-homologe Sequenz, HA-tag kodierende Sequenz) und dem BAC-Plasmid mCMV-BAC_ΔIE2DTR über die homologen Sequenzen.

Für die zur Insertion des HA-tags verwendete Ein-Schritt BAC-Rekombination am 3'-terminalen Ende des *DTR*-Gens wurden die Oligonukleotide DTR-HA_for und DTR-HA_rev (s. Abb. 3.10) verwendet. Der *Primer* DTR-HA_for enthielt neben den 43bp der *DTR*-homologen Sequenz und der 17bp-langen *priming*-Region für das Plasmid pGP704-Kan zusätzlich die HA-Epitop-Sequenz mit einem neuen Stop-Codon, die an das 3'-Ende des *DTR*-Gens fusioniert werden sollte. Durch eine *touch-down*-PCR wurde ein 1,195kbp großes DNA-Rekombinationsfragment mit dem Plasmid pGP704-Kan als Matrizen-DNA amplifiziert. Das Amplifikat enthält das *Kan^{Res}*-Gen, flankiert von FRT-Sequenzen, *DTR*-Homologien, sowie am 3'-Ende die HA-Epitop-Sequenz.

DTR-HA_for



DTR-HA_rev

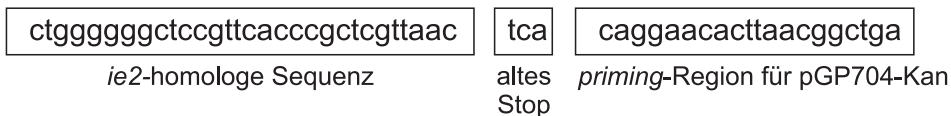


Abb. 3.10: *Primer*-Design zur Insertion der HA-Epitop-Sequenz. Die *Primer* zur Amplifizierung des *Kan^{Res}*-Gens enthalten virale bzw. *DTR*-homologe Sequenzen und *priming*-Regionen in pGP704-Kan. Der Vorwärts-*Primer* enthält zudem die Sequenz des HA-tags und ein neues Stop-Codon. Der Rückwärts-*Primer* enthält das alte Stop-Codon. Das durch die *touch-down*-PCR entstandene Amplifikat hat eine Größe von 1,195kbp.

Nach der Durchführung der BAC-Mutagenese entstand zunächst das rekombinante BAC-Plasmid mCMV-BAC_ΔIE2DTR-HA. Die Übersicht des Klonierungsschemas ist in Abb. 3.11 dargestellt.

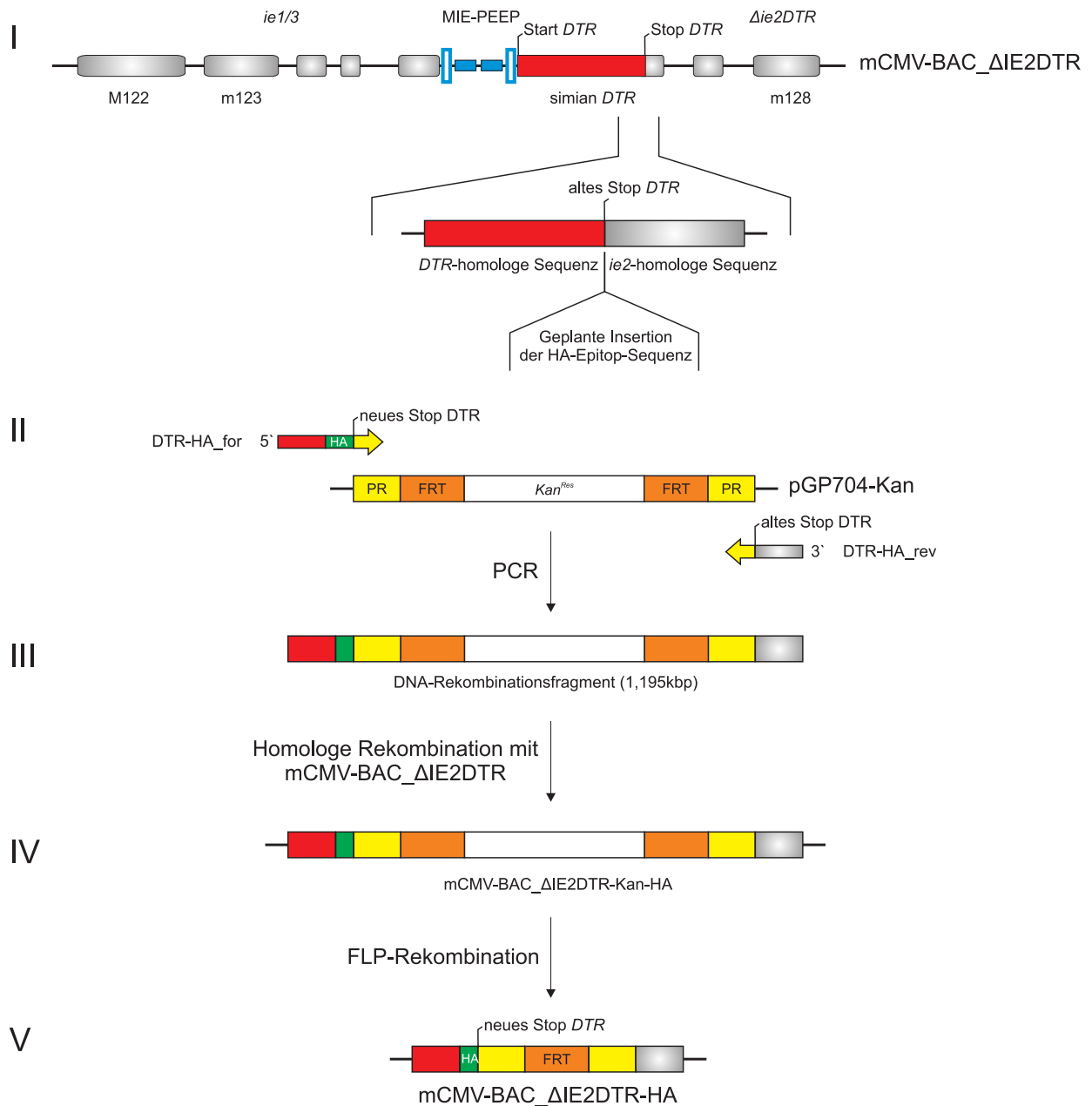


Abb. 3.11: Strategie zur Insertion einer HA-Epitop-Sequenz an das 3'-Ende des *DTR*-Gens. I) Schematische Darstellung des rekombinanten MIE-Lokus mit den Genen *ie1/3*, *ie2* (grau) und dem *DTR*-Gen (rot) in mCMV-BAC_ΔIE2DTR. Gezeigt ist die Vergrößerung der Insertionsstelle des HA-tags am 3'-Ende des *DTR*-Gens und die Position der viralen Homologiesequenz. II) *Primer*-Design und PCR mit dem dargestellten *Primer*-Paar DTR-HA_for und DTR-HA_rev, sowie dem Plasmid pGP704-Kan als Matrize. *Priming*-Region (PR, gelb); *Kan*-Resistenzgen (*Kan^{Res}*, weiß); HA-tag (grün); *DTR*-Gen (rot). III) Gezeigt ist das entstandene DNA-Rekombinationsfragment mit 1,195kbp Größe. Es trägt die entsprechende virale Homologiesequenz (*ie2*, *DTR*), den HA-tag mit Stop-Codon (grün), die nicht kodierenden *priming*-Regionen des Plasmids pGP704-Kan (gelb), sowie die jeweils das *Kan^{Res}*-Gen (weiß) flankierenden FRT-Sequenzen (orange). IV) Nach der homologen Rekombination wurden die beschriebenen DNA-Elemente in das mCMV-BAC_ΔIE2DTR integriert und (V) die *Kan^{Res}*-Kassette durch die FLP-Rekombination entfernt, wobei ein neues rekombinantes BAC-Plasmid mCMV-BAC_ΔIE2DTR-HA entstand mit der fusionierten HA-Epitop-Sequenz am 3'-Ende des *DTR*-Gens. Fremdsequenzen des Plasmids der *priming*-Region, sowie eine FRT-Sequenz können nicht entfernt werden und bleiben dauerhaft erhalten.

3.3.1 Entfernung des Selektionsmarkers nach der Mutagenese

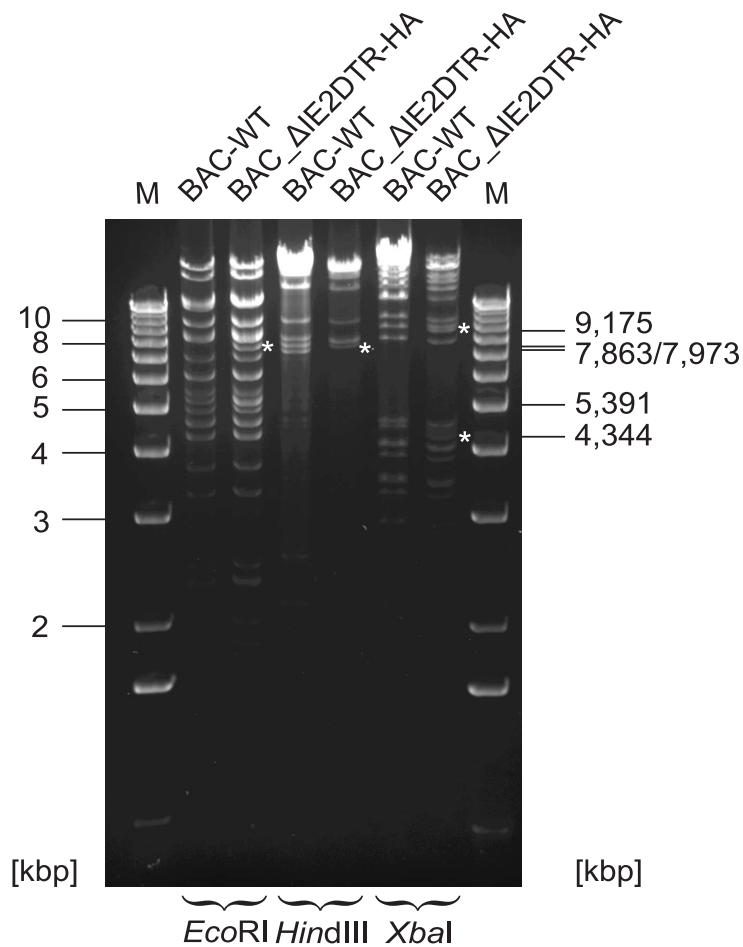
Analog zur Zwei-Schritt BAC-Mutagenese erfordert die Ein-Schritt BAC-Mutagenese die Insertion eines Resistenzmarkers (hier Kan^{Res}) an die Position der zu deletierenden bzw. insertierenden Sequenz. Dieses Resistenzgen muss jedoch nach der Mutagenese entfernt werden. Dieser Vorgang wird hier durch die FRT-Erkennungssequenz ermöglicht, die das Resistenzgen flankiert. *E. coli* SW105 enthalten eine FLP-Rekombinase (McLeod *et al.*, 1986), deren Expression durch Arabinose induziert werden kann. Die FLP-Rekombinase erkennt die FLP-Sequenz und es kommt zur Rekombination zwischen zwei gleich orientierten FRT-Erkennungssequenzen und dadurch zur Exzision von nicht viralen Sequenzen, die zwischen den beiden FRT-Sequenzen liegen. Durch die Rekombination verbleibt jedoch eine einzige FRT-Erkennungssequenz im Plasmid zurück. Das generierte BAC-Plasmid mCMV-BAC_ΔIE2DTR-HA enthält somit zusätzlich zum *DTR*-Gen die HA-Epitop-Sequenz und insgesamt 88bp Fremdsequenz im viralen Genom, die nicht entfernt werden kann (s. Abb. 3.13).

3.3.2 Restriktionsanalyse des rekombinanten mCMV-BAC_ΔIE2DTR-HA

Nach der Exzision des Kan^{Res} -Gens wurde die DNA-Qualität und die Integration des BAC-Plasmids in der Rekombinanten mCMV-BAC_ΔIE2DTR-HA überprüft. Dazu wurde die DNA des BAC-Klons isoliert, mit verschiedenen Restriktionsenzymen (*EcoRI*, *HindIII* und *XbaI*) geschnitten und auf einem Agarosegel aufgetrennt (s. Abb. 3.12-A).

Durch den *HindIII*-Restriktionsenzymverdau konnte die Integrität des *DTR*-Gens mit seiner 3'-terminalen HA-Epitop-Sequenz bestätigt werden. Die 7,161kbp-Bande entfällt, statt dessen kommt jedoch eine Bande bei 7,863kbp (Doppelbande mit 7,958kbp) hinzu, in Abb. 3.12-A beides mit * gekennzeichnet. Die Insertion der HA-Epitop-Sequenz führt durch die verbleibende FRT- und Fremdsequenz und die darin enthaltenen zusätzlichen Schnittstellen für *XbaI* und *EcoRI* zudem zu zusätzlichen Banden nach dem Restriktionsenzymverdau mit *EcoRI* und *XbaI* im Vergleich zum mCMV-BAC-WT (s. Abb. 3.12-B). Der *EcoRI*-Restriktionsenzymverdau zeigt diese zusätzlichen DNA-Fragmente bei 7,973kbp und 5,391kbp, der *XbaI*-Verdau bei 4,344kbp und 9,175kbp, in Abb. 3.12-B ebenfalls mit * gekennzeichnet. Einige Banden sind hinzugekommen bzw. sind entfallen, die nicht eindeutig von den ursprünglichen Banden diskriminiert werden können. Nach dem *EcoRI*-Verdau fehlt bei der HA-Mutante die Bande bei 12,662kbp, eine Bande bei 5,391kbp kommt hinzu, die nicht von den Banden mit 5,161kbp und 5,480kbp unterschieden werden kann. Beim *XbaI*-Verdau fehlt ein DNA-Fragment bei 12,824kbp. Da die 12kbp-Bande durch ihre Größe und die geringe Auftrennung nicht von anderen Banden unterschieden werden kann, wurde die korrekte Insertion der HA-Epitop-Sequenz durch eine Sequenzierung bestätigt (s. Abb. 3.13).

A



B mCMV-BAC-WT

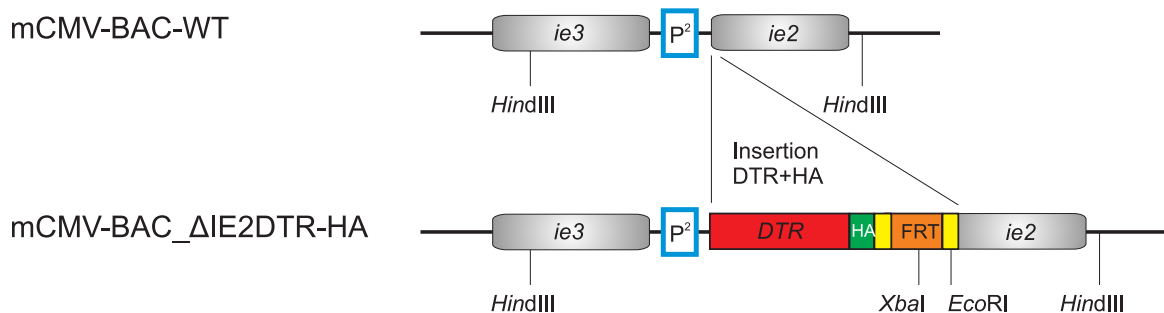


Abb. 3.12: Integrität des mCMV-BAC-Genoms nach homologer Rekombination in *E. coli* SW105. A) Gelelektrophoretische Auftrennung des rekombinanten BAC-Plasmids nach Ein-Schritt BAC-Rekombination zur Überprüfung der Integrität des BAC-Plasmids. BAC-DNA aus BAC-Maxipräparation wurde mit den Enzymen *EcoRI*, *HindIII* und *XbaI* restringiert und in einem 0,7%-igen TBE-Agarosegel aufgetragen. Der Klon mCMV-BAC_ΔIE2DTR-HA zeigt das für mCMV-BAC-WT typische Genomfragment-Muster für alle drei Restriktionsenzyme. Die durch die Insertion der DTR-HA-Sequenz zusätzlichen Banden nach Restriktionsenzymverdau mit *EcoRI* bei 7,973kbp und 5,391kbp, für *HindIII* bei 7,863kbp und für *XbaI* bei 4,344kbp und 9,175kbp sind mit * markiert. Bei dem *EcoRI*-Restriktionsenzymverdau bzw. *XbaI*-Verdau entfällt jeweils eine Bande bei 12,662kbp für *EcoRI* und bei 12,824kbp für *XbaI*, bei dem *HindIII*-Verdau die 7,161kbp-Bande. Spur M, 1kbp DNA-Längenstandard. B) Schematische Darstellung der MIE-Genregion und der verwendeten Restriktionsenzyme.

3.3.3 Sequenzanalyse des rekombinanten mCMV-BAC_ΔIE2DTR-HA

Nach der Überprüfung der BAC-Integrität musste die Insertion der HA-Epitop-Sequenz durch eine Sequenzierung bestätigt werden. Dazu wurden *Primer* ausgewählt, welche die DTR-HA-Sequenz flankieren (*Primer* ie2.3 und Na1x). Dadurch konnte die Nukleotid-genaue Fusion der HA-Epitop-Sequenz an das 3'-Ende des *DTR*-Gens bei gleichzeitiger Deletion des ursprünglichen Stop-Codons bestätigt werden. Der Übergang zwischen *DTR*-Gen und der 3'-terminalen HA-tag-Sequenz, sowie die nicht viralen Fremdsequenzen des Ausgangsplasmids pGP704-Kan und die verbleibende FRT-Sequenz, sind in Abb. 3.13 dargestellt. Die den Integrationsort des HA-tags und des kompletten *DTR*-Gens umfassende *ie2*-Region ist im Anhang A.3 zu finden.

```

agagaaagtg aagttgggca tgactaatc cactaccca tacgacgtcc cagactacgc
E E K V K L G M T N S H Y P Y D V P D Y
>.....DTR.....>>
                                     >>.....HA-tag.....>

                                     XbaI
ttgaaggacg acgacgacaa gtaagaagtt cctattctct agaaagtata ggaacttcga
Stop
A -
> HA-tag
>>...Fremdsequenz...>>
                                     >>.....FRT-Sequenz.....>>

```

Abb. 3.13: Sequenzausschnitt der HA-Epitop-Fusion an das 3'-Ende des *DTR*-Gens.

Zur Überprüfung der Nukleotid-genaue Fusion der HA-Epitop-Sequenz an das 3'-Ende des *DTR*-Gens, wurde der *DTR*-HA-tag Übergang mit dem *Primer*-Paar ie2.3 und Na1x sequenziert. Gezeigt ist ein Ausschnitt des 3'-Endes des *DTR*-Gens (rot) mit der korrekten Fusion des HA-tags (grün), dem neu eingebrachten Stop-Codon (blau), sowie die nicht zu entfernenden Fremd- und FRT-Sequenzen (schwarz).

Eine schematische Übersicht des MIE-Lokus der drei rekombinanten BAC-Plasmide mCMV-BAC_ΔIE2DTR, mCMV-BAC-IE1L176A_ΔIE2DTR und mCMV-BAC_ΔIE2DTR-HA ist in Abb. 3.14 dargestellt.

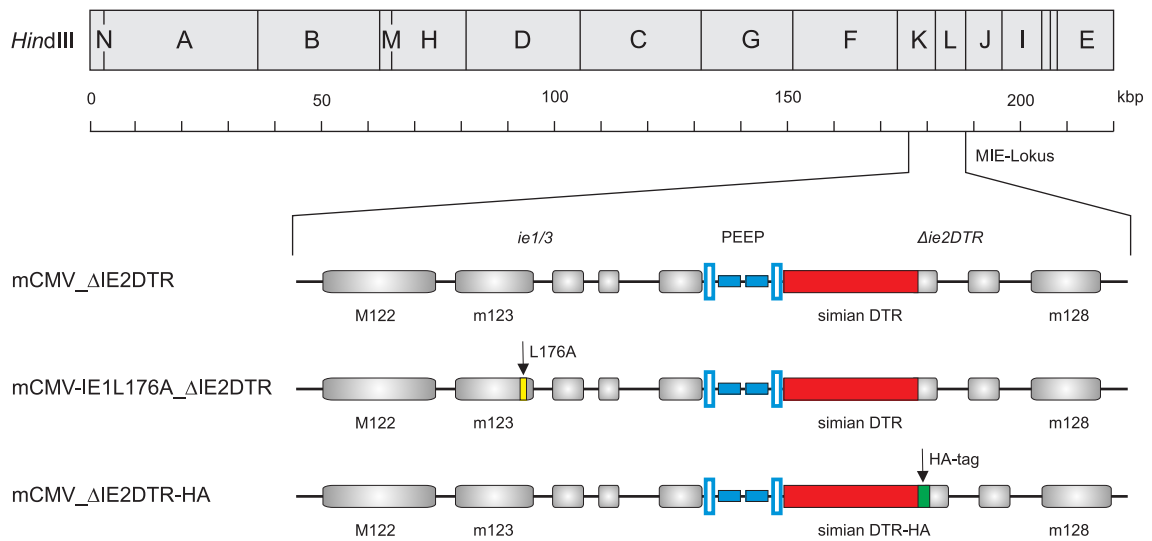


Abb. 3.14: Lokalisation des *DTR*-Gens im mCMV-Genom. *Hind*III-Karte des mCMV-Genoms der Rekombinanten mit einem Ausschnitt des K- und L-Fragments und der dort lokalisierten MIE-Region. Gezeigt ist das Basiskonstrukt mit dem simian *DTR*-Gen (rot) unter der Kontrolle des *ie2*-Promotors. Die Insertion des simian *DTR*-Gens in die MIE-Region erfolgte durch homologe Rekombination mittels Zwei-Schritt BAC-Rekombination. Das rekombinante Virus mCMV-IE1L176A_ΔIE2DTR wurde ebenfalls mittels Zwei-Schritt BAC-Mutagenese hergestellt, unter Verwendung des mCMV-BAC-IE1L176A_ΔIE2DTR als BAC-*backbone*, bei dem die Anker-AS des IE1-Peptids (L176A) (gelb) ausgetauscht wurde. Die Insertion des HA-tags (grün) erfolgte mittels Ein-Schritt BAC-Rekombination. PEEP (blau), *Major Immediate Early Promoter1-Enhancer1-Enhancer2-Promoter2*.

Schlussfolgerung:

Die Integrität des mCMV-Genoms innerhalb des rekombinanten mCMV-BAC-Plasmids mCMV-BAC_ΔIE2DTR-HA, sowie die Insertion des *DTR*-Gens konnte mittels Restriktionsenzymverdau bestätigt werden. Die Nukleotid-genaue Fusion der HA-tag kodierenden Sequenz an das 3'-Ende des *DTR*-Gens wurde durch Sequenzierung verifiziert.

3.4 Herstellung rekombinanter mCMV aus BAC-Plasmiden

Zur Rekonstitution rekombinanter mCMV aus BAC-Plasmiden wurden MEF verwendet. Dazu wurden diese in 6-*well*-Zellkulturplatten, wenn diese zu 60% bis 70% konfluent bewachsen waren, mittels PolyFect mit der rekombinanten BAC-DNA transfiziert (s. 2.2.5.2). Da sich die Konzentration der BAC-DNA photometrisch nicht bestimmen lässt, wurden verschiedene Volumenverhältnisse von BAC-DNA und PolyFect für die Transfektion verwendet. 5 Tage nach der Transfektion sollte eine Plaquebildung zu beobachten sein. Die besten Transfektionsergebnisse wurden bei einem DNA-Volumen von 10 μ l bis 15 μ l verzeichnet.

3.4.1 Exzision der BAC-Sequenzen

Nach erfolgreicher Transfektion der MEF mit der BAC-DNA ist es essentiell, nicht virale Sequenzen (BAC-Vektorsequenz) aus dem Virusgenom zu entfernen. Die auf dem von Wagner (Wagner *et al.*, 1999) konstruierten C3X basierenden Rekombinanten ermöglichen die Exzision der BAC-Sequenzen durch homologe Rekombination während wiederholter Passagierung auf MEF. Durch die Passagierung werden die BAC-Vektorsequenz flankierenden Sequenzwiederholungen von zellulären Rekombinationsmechanismen erkannt (Sugawara *et al.*, 2000). Dies führt durch homologe Rekombination zur Eliminierung der zwischen den duplizierten Sequenzen liegenden BAC-Vektorsequenzen und damit zu einem mCMV-Genom frei von BAC-Vektorsequenzen. Durch die Eliminierung der BAC-Vektorsequenzen hat sich die Länge des mCMV-Genoms auf seine ursprüngliche Länge verkürzt und wird deshalb beim *packaging* bevorzugt in den viralen Kapsiden verpackt. Infolge dessen reichern sich BAC-freie Viren durch das Passagieren an (Wagner *et al.*, 1999). Es müssen etwa fünf Passagen auf MEF durchlaufen werden, um eine ausreichende Zahl an Rekombinationsereignissen zu ermöglichen. Der Nachweis der Exzision der BAC-Sequenz wurde mittels qPCR (s. 2.4.14.3) mit *Primern*, spezifisch für die BAC-Sequenz, durchgeführt (s. Tab. 2.14).

3.4.2 Quantifizierung von BAC-Sequenzen aus Überständen rekonstituierter mCMV-Rekombinanten

Um die Exzision der BAC-Sequenzen in den rekonstituierten Rekombinanten zu bestätigen, wurde die DNA aus Virusüberständen der fünften Passage nach der Rekonstitution aufgereinigt (s. 2.4.4.7). Die DNA diente anschließend als *Template* in der BAC-Sequenz-spezifischen qPCR (s. 2.4.14). Bei der Amplifikation mit den *Primern* BAC_taq_for und BAC_taq_rev entsteht bei Vorhandensein von BAC-Sequenzen ein 81bp großes Amplifikat. Um die Zahl der BAC-Sequenzen auf die Zahl der Virusgenome normieren zu können, wurde zudem die Zahl der viralen Genome durch eine M55- (*gB*) spezifische qPCR bestimmt. Die *Primer* gB_Taq_For2 und gB_Taq_Rev2 dienten hier zur Amplifizierung eines 80bp großen PCR-Produkts des viralen Gens. Die Quantifizierung erfolgte nach Protokoll (s. 2.4.14.3) in einem ABI Prism 7500. Zur Herstellung einer Standardreihe diente das Plasmid pDrive_gB_PTHrP_BAC (Lemmermann *et al.*, 2010). Es wurde die Anzahl an BAC-Sequenzen pro 1×10^6 viralen Genomen bestimmt. Waren in den Virusüberständen weniger als 100 BAC-Sequenzen pro 1×10^6 Virusgenomen nachweisbar, wurde ein gereinigter Virusstock generiert (s. 2.3.3). Die Ergebnisse der Quantifizierung der BAC-Sequenzen sind in Tab. 3.1 zusammengefasst.

Tab. 3.1: Quantifizierung der BAC-Sequenz aus Überständen der fünften Passage rekonstituierter mCMV-Rekombinanten

mCMV-Rekombinante	BAC-Sequenz		Genome (M55/ <i>gB</i>)		BAC-Sequenzen pro 1×10^6 Genome	
	Ü1	Ü2	Ü1	Ü2	Ü1	Ü2
Δ IE2DTR	0	$1,90 \times 10^1$	$1,63 \times 10^6$	$1,57 \times 10^4$	0	$1,21 \times 10^3$
IE1L176A_ Δ IE2DTR	$2,90 \times 10^6$	$1,05 \times 10^2$	$2,68 \times 10^6$	$1,87 \times 10^6$	$1,08 \times 10^6$	$5,6 \times 10^1$
Δ IE2DTR-HA	1	0	$3,80 \times 10^6$	$1,84 \times 10^6$	0	0

Ü, Überstand aus *well* 1 bzw. 2 der Virusmutanten; Δ IE2DTR, mCMV_ Δ IE2DTR; IE1L176A_ Δ IE2DTR, mCMV-IE1L176A_ Δ IE2DTR; Δ IE2DTR-HA, mCMV_ Δ IE2DTR-HA

Da es jedoch selbst nach der fünften Passagierung noch einige Virusüberstände gab, in denen mehr als 100 BAC-Sequenzen pro 1×10^6 Virusgenomen nachgewiesen werden konnten, ist die Quantifizierung der BAC-Sequenzen nach jeder Virusrekonstitution unumgänglich. Zu vermerken ist, dass nur von den BAC-freien Viren, bei denen weniger als 100 BAC-Sequenzen pro 1×10^6 Virusgenome nachgewiesen werden konnten, gereinigte Virusstocks generiert wurden. Folglich sind alle Virusstocks, die für weitere Zellkulturversuche und *in vivo*-Versuche verwendet wurden, BAC-frei.

Schlussfolgerung:

Durch Transfektion von rekombinanten mCMV-BAC-Plasmiden in MEF wurden erfolgreich rekombinante mCMV generiert. Alle verwendeten Virusstocks sind BAC-frei, da durch wiederholte Passagierung und homologe Rekombination in den Zellen der BAC-Vektoranteil aus dem Virusgenom entfernt wurde.

3.5 Charakterisierung rekombinanter mCMV in Zellkultur

Das *DTR*-Gen steht unter direkter Kontrolle des *ie2*-Promotors. Dadurch sollte das *DTR*-Protein unter IE-Bedingungen nachweisbar sein, das *IE2*-Protein dagegen nicht, da nach dem *DTR*-Gen ein Stop-Codon inkloniert wurde. Zusätzlich sollen in diesem Abschnitt die *in vitro*-Eigenschaften und die Funktionalität des *DTR* getestet werden.

3.5.1 Nachweis des DTR-Proteins im Western Blot

Das Vorhandensein des *DTR*-Gens im Virusgenom wurde bereits durch einen Restriktionsenzymverdau (s. 3.2.2) und durch eine Sequenzierung (s. 3.2.3) bestätigt. Durch Western Blot-Analysen sollte nun festgestellt werden, ob das DTR-Protein unter IE-Bedingungen translatiert wird. Zum Nachweis des DTR-Proteins wurden MEF mit mCMV_ΔIE2DTR zentrifugal mit einer MOI=4 infiziert. Um im Western Blot eine Positivkontrolle für den polyklonalen DTR-Ak (α -HB-EGF) mitführen zu können, wurde das Expressionsplasmid pcDNA3.1/*myc*-HisA_DTR hergestellt, das den DTR in transfizierten COS-Zellen überexprimiert.

3.5.1.1 Herstellung des Expressionsplasmids pcDNA3.1/*myc*-HisA_DTR

Zur Herstellung des DTR-Expressionsplasmids pcDNA3.1/*myc*-HisA_DTR (s. Abb. 3.15) wurde das *DTR*-Gen aus dem Plasmid pBS_DTR_SV40pA mit zwei *Primern* amplifiziert, die jeweils eine *Hind*III-Schnittstelle (*Primer* DTR_for_HindIII) bzw. eine *Bam*HI-Schnittstelle (*Primer* DTR_rev_BamHI) enthalten. Über diese zwei Schnittstellen wurde später das DTR-Amplifikat in die *multiple cloning site* (MCS) des Expressionsplasmids pcDNA3.1/*myc*-HisA (invitrogen, Karlsruhe) gerichtet kloniert. Dazu wurden sowohl das 658bp große DTR-PCR-Produkt, als auch das Expressionsplasmid mit den Restriktionsenzymen *Hind*III und *Bam*HI geschnitten und miteinander ligiert (22°C; 3,5h; Hitzeinaktivierung bei 65°C für 20min).

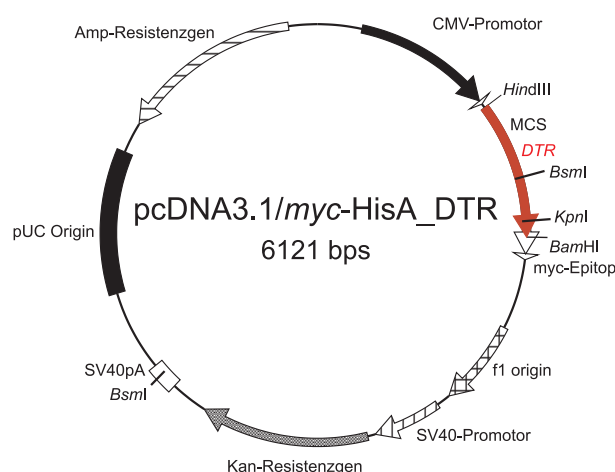


Abb. 3.15: Schematische Darstellung des Expressionsplasmids pcDNA3.1/*myc*-HisA_DTR. Gezeigt ist das Expressionsplasmid pcDNA3.1/*myc*-HisA_DTR mit seinen *Amp*^{Res}- und *Kan*^{Res}-Genen, sowie seinem enthaltenen hCMV-Promotor und dem *DTR*-Gen. Die Überexpression des in die MCS klonierten *DTR*-Gens (rot) in transfizierten COS-7-Zellen wird somit ermöglicht.

Von ausgewählten Amp-resistenten Klonen wurde die DNA aus den Bakterien isoliert und die Insertion des *DTR*-Gens durch einen *KpnI*-Restriktionsenzymverdau verifiziert (s. Abb. 3.16-A). Der leere Vektor ergibt lediglich ein lineares Fragment von 5,5kbp, das Plasmid mit dem insertierten *DTR*-Gen ergibt nach dem Restriktionsenzymverdau mit *KpnI* ein lineares Fragment von 6,1kbp Länge. Ein Restriktionsenzymverdau mit *BsmI*, der bei einem insertierten *DTR*-Gen Banden bei 2,6kbp und 3,5kbp erwarten lässt, bestätigt zusätzlich die Anwesenheit des *DTR*-Gens (s. Abb. 3.16-B).

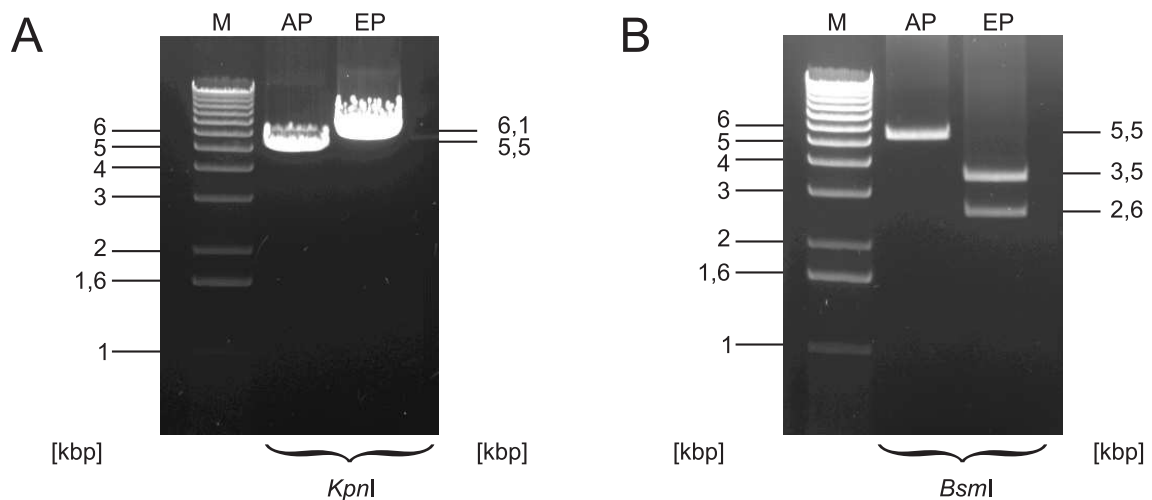


Abb. 3.16: Gelelektrophoretische Auftrennung des DTR-Expressionsplasmids pcDNA3.1/*myc*-HisA_*DTR* nach Restriktionsenzymverdau. Die gelelektrophoretische Auftrennung des DTR-Expressionsplasmids (EP) pcDNA3.1/*myc*-HisA_*DTR* zeigt nach Restriktionsenzymverdau mit A) *KpnI* ein DNA-Fragment von 6,1kbp im Vergleich zum Ausgangsplasmid (AP) pcDNA3.1/*myc*-HisA mit einer Fragmentgröße von 5,5kbp. Der Restriktionsenzymverdau mit B) *BsmI* zeigt durch die Insertion der *DTR*-Sequenz Fragmentgrößen von 2,6kbp und 3,5kbp im Vergleich zu 5,5kbp ohne das *DTR*-Gen. Spur M, 1kbp DNA-Längenstandard.

Zur Überexpression des DTR-Proteins wurden 5×10^5 COS-7 Zellen in einer 10cm-Zellkulturschale ausgesät und am nächsten Tag, als sie zu 40% bis 60% konfluent bewachsen waren, mit 4 μ g pcDNA3.1/*myc*-HisA_*DTR* Plasmid-DNA transfiziert (s. 2.2.5.1). Dazu wurde die Plasmid-DNA in 300 μ l DMEM-Medium verdünnt, mit 25 μ l PolyFect supplementiert und zur Komplexbildung 10min bei RT inkubiert. 48h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und Gesamtprotein aus den Zelllysaten isoliert (s. 2.6.1).

Um sicher zu stellen, dass der DTR in allen Rekombinanten unter IE-Bedingungen exprimiert wird, wurden MEF unter Gabe von Cycloheximid (CH) gefolgt von Actinomycin D (ActD) mit den Mutanten mCMV_ Δ IE2DTR, mCMV-IE1L176A_ Δ IE2DTR und mCMV_ Δ IE2DTR-HA mit einer MOI=4 zentrifugal infiziert. Dazu wurden zu 60% bis 80% konfluent bewachsene MEF nach der Infektion 3h in Anwesenheit von CH inkubiert. CH hemmt die Aktivität der Peptidyltransferase der 60S-Untereinheit der Ribosomen und verhindert somit die Translation. Da nun keine IE-Proteine und demnach keine Transaktivatorproteine hergestellt werden, bleibt eine negative *feedback*-Regulation aus und *IE*-Transkripte reichern sich an. Durch die anschließende Inkubation mit ActD für weitere 3h wurde die RNA-Synthese, d.h. die Transkription gehemmt. Dies führte ausschließlich zur Translation der angereicherten *IE*-Transkripte.

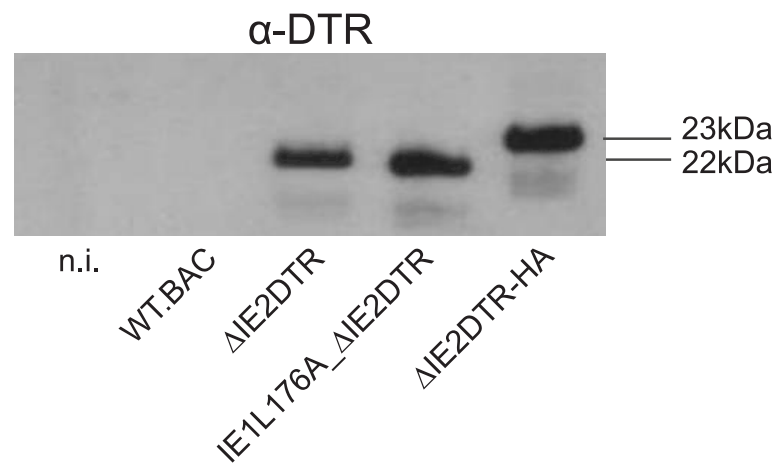


Abb. 3.18: Western Blot-Analyse zum Nachweis der DTR-Proteinexpression unter IE-Bedingungen. Western Blot-Analyse des DTR-Protein aus Gesamtzelllysaten mCMV-WT.BAC (WT.BAC), mCMV_ Δ IE2DTR (Δ IE2DTR), mCMV-IE1L176A_ Δ IE2DTR (IE1L176A_ Δ IE2DTR) und mCMV_ Δ IE2DTR-HA (Δ IE2DTR-HA) zentrifugal infizierter MEF (MOI=4). Die Zellen wurden direkt nach der Infektion mit den angegebenen Viren für 3h mit CH behandelt und der CH-Block durch Auswaschen des CH entfernt. Anschließend wurden die Zellen für weitere 3h mit ActD inkubiert. Auf ein 12,5%iges SDS-Polyacrylamidgel wurden 30 μ g Gesamtprotein aufgetragen und anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion des DTR-Proteins erfolgte mit dem polyklonalen α -DTR Ak (α -HB-EGF) (1:100 Verdünnung) nach Chemilumineszenz-Färbung des sekundären HRP-gekoppelten Ak mit dem ECLplus Western Blotting Detection Reagenz. n.i., nicht infiziert; 22kDa: MM des DTR-Proteins; 23kDa: MM des DTR-Proteins mit zusätzlichem 1kDa für das MM des HA-tags.

Die Western Blot-Analyse (s. Abb. 3.18) zeigt sehr deutlich, dass das DTR-Protein in allen DTR-Mutanten mit der erwarteten Größe von ungefähr 22kDa (bzw. von ca. 23kDa durch den HA-tag) unter IE-Bedingungen exprimiert wird, wohingegen in mCMV-WT.BAC der DTR nicht nachweisbar ist.

3.5.2 Nachweis des DTR durch HA-Epitop-Markierung

Durch Western Blot-Analysen mit einem gegen den DTR gerichteten Ak konnte bereits bestätigt werden, dass das Protein unter IE-Bedingungen exprimiert wird und bis mindestens 8h nach der Infektion nachweisbar ist. Ob sich der Rezeptor jedoch an der Oberfläche befindet, konnte durch diesen Versuch nicht geklärt werden. Um das DTR-Protein in der Zelle lokalisieren zu können, wurde an das C-terminale Ende des DTR ein HA-tag angehängt (s. 2.4.16.2), da der α -DTR Ak für eine Immunfluoreszenz-Färbung (IF) nicht geeignet ist. Die Insertion des HA-tags wurde weiterhin dazu verwendet, die Western Blot-Ergebnisse der direkten DTR-Ak-Färbung zu bestätigen. Die Western Blot-Analyse von mCMV_ Δ IE2DTR-HA infizierten MEF ist in Abb. 3.19-A gezeigt. Zur Detektion des DTR-HA Proteins im Western Blot wurden zu 60% bis 80% konfluent bewachsene MEF in einer 10cm-Zellkulturschale mit einer MOI=4 mit der Mutante mCMV_ Δ IE2DTR-HA zentrifugal infiziert und über einen Zeitraum von 6h zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion Gesamtprotein aus Zelllysaten isoliert. Gesamtprotein der jeweiligen Zelllysate wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und die Proteine ihrer Größe nach in der SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran erfolgte die Detektion des HA-Epitops mit einem monoklonalen α -HA Ak (α -HA Maus) und anschließender Chemilumineszenz-Färbung des sekundären HRP-gekoppelten Ak mit Hilfe des ECLplus Western Blotting Detection Reagenz.

Zur Detektion des HA-tags in der IF wurden 7×10^4 MEF auf Deckgläschen ausgesät und diese am nächsten Tag, ausgehend von 1×10^5 Zellen, mit einer MOI=4 mit der Virusmutante mCMV_ Δ IE2DTR-HA zentrifugal infiziert. 6h nach der Infektion wurden die Zellen fixiert und der DTR durch seinen HA-tag mittels eines primären Ak gegen die HA-Epitop-Sequenz und eines sekundären fluoreszierenden Ak markiert (s. Abb. 3.19-B). Durch die IF konnte zwar das DTR-Protein 6h nach der Infektion in der Zelle nachgewiesen werden, jedoch konnte durch die geringe Fluoreszenz nicht geklärt werden, ob sich der Rezeptor an der Oberfläche der Zelle befindet.

Durch den HA-tag am C-terminalen Ende des DTR-Proteins konnte die Expression des Proteins zusätzlich zu den Analysen mit dem α -HB-EGF Ak bestätigt werden. Durch die spezifische Ak-Bindung konnte das DTR-HA Protein bereits 2h nach der Infektion (durch die schwache Bande in Abb. 3.19-A mit * gekennzeichnet) bis mindestens 6h nach der Infektion nachgewiesen werden.

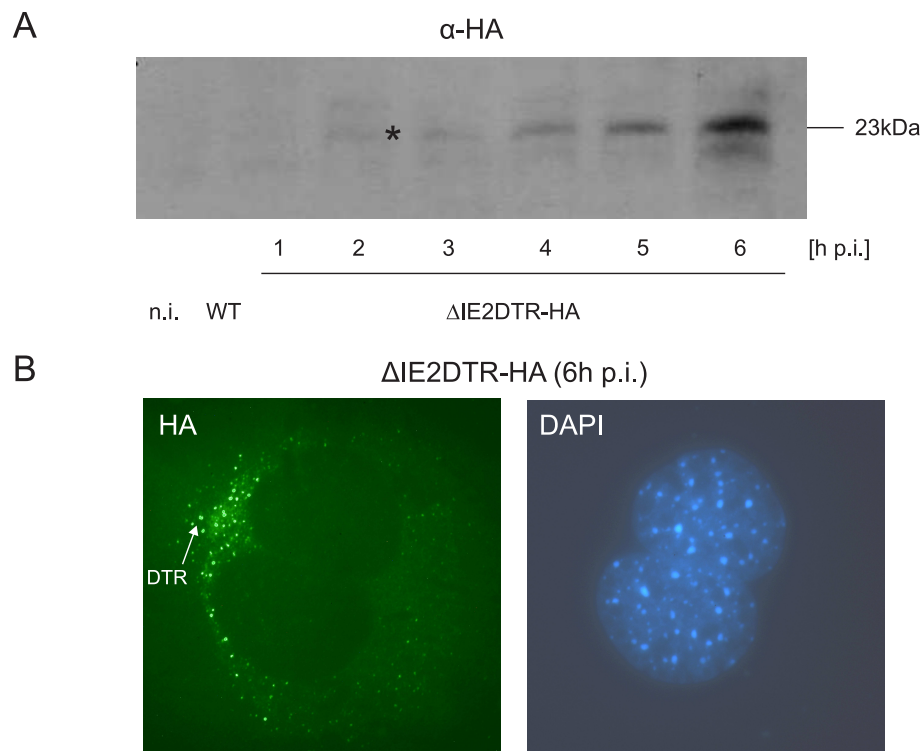


Abb. 3.19: Expressionkinetik und Lokalisation des DTR-Proteins mittels HA-Epitop-Markierung. A) Western Blot-Analyse von Gesamtzelllysaten aus MEF, die mit mCMV_ΔIE2DTR-HA bzw. mCMV-WT.BAC (WT) zentrifugal infiziert wurden (MOI=4). Zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Infektion (WT=6h p.i.) wurden die Zellen geerntet und Gesamtprotein aus den Zelllysaten hergestellt. Die Auftrennung von 100μg Gesamtprotein pro Zeitpunkt erfolgte in einem 12,5%-igen SDS-Polyacrylamidgel. Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran wurde das HA-Epitop mit dem monoklonalen α-HA Ak (α-Maus; 1:2000 Verdünnung) detektiert und die Ak-Bindung durch Chemilumineszenz-Färbung des sekundären HRP-gekoppelten Ak mit dem ECLplus Western Blotting Detection Reagenz visualisiert. Die mit * markierte Bande 2h nach der Infektion ist nur sehr schwach zu sehen. B) MEF wurden, ausgehend von 1×10^5 Zellen mit der Mutante mCMV_ΔIE2DTR-HA (ΔIE2DTR-HA) zentrifugal mit einer MOI=4 infiziert und 6h nach der Infektion wurden die Zellen mit PFA fixiert. Der Zeitpunkt $t=0$ definiert den Start der Infektion vor der Zentrifugation. Die Detektion des HA-tags am DTR-Protein erfolgte in der indirekten IF mit dem α-HA Ak (α-HA Maus), sowie einem Alexa Fluor 488 konjugierten Sekundär-Ak (AF 488, α-Maus). Das Fluorochrom wurde mit einem Argonlaser ($\lambda=488\text{nm}$) angeregt und im Fluoreszenzmikroskop detektiert. Die HA-Epitop-markierten DTR sind hier grün dargestellt. Die Darstellung des Zellkerns (blau) erfolgte durch die Färbung der DNA mit Hoechst 33342.

3.5.3 Überprüfung der IE2-Proteinexpression

Durch eine Western Blot-Analyse gegen das IE2-Protein sollte ausgeschlossen werden, dass das inklonierte Stop-Codon hinter dem *DTR*-Gen bei der Translation überlesen wurde und sich ein Fusionsprotein von DTR und IE2 gebildet hat. Zur Isolierung von Gesamtprotein aus Zelllysaten wurden MEF mit mCMV-WT.BAC bzw. den DTR-Mutanten mCMV_ΔIE2DTR, mCMV-IE1L176A_ΔIE2DTR und mCMV_ΔIE2DTR-HA zentrifugal mit einer MOI=4 infiziert.

Um eine höhere Proteinausbeute zu erhalten, wurden zu 60% bis 80% konfluent bewachsene MEF für 3h in Anwesenheit von CH infiziert und anschließend weitere 3h mit ActD inkubiert (s. 3.5.1). Der Western Blot in Abb. 3.20 zeigt deutlich, dass im Gegensatz zu mCMV-WT.BAC, bei dem nach insgesamt 6h Behandlung mit CH und ActD, das IE2-Protein deutlich nachgewiesen werden konnte, bei allen DTR-Mutanten keinerlei IE2-Protein detektierbar war. Die Bildung des 43kDa großen IE2-Proteins, sowie eines möglichen DTR-IE2 Fusionsproteins von ungefähr 63kDa konnte somit wie erwartet ausgeschlossen werden.

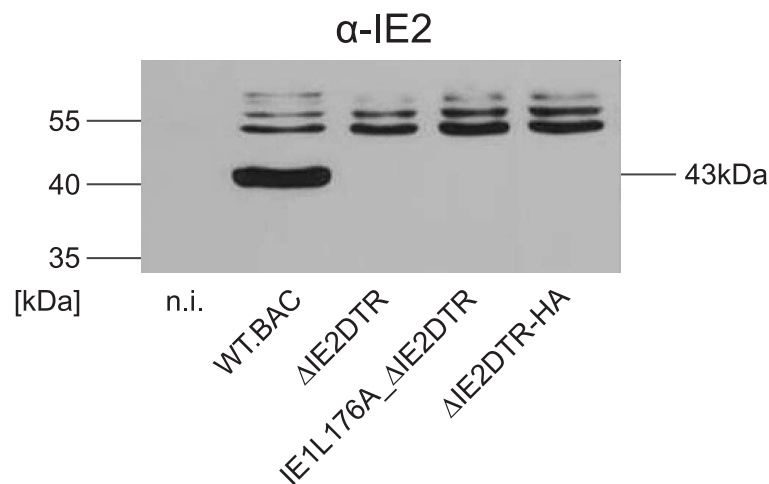


Abb. 3.20: Western Blot-Analyse zum Nachweis der IE2-Proteinexpression. Western Blot-Analyse gegen das IE2-Protein von Gesamtzelllysaten aus mCMV-WT.BAC, mCMV_ΔIE2DTR, mCMV-IE1L176A_ΔIE2DTR und mCMV_ΔIE2DTR-HA infizierten MEF (MOI=4). Zellen wurden direkt nach der Infektion mit den angegebenen Viren für 3h mit CH behandelt und anschließend weitere 3h mit ActD inkubiert. Auf ein 12,5%-iges SDS-Polyacrylamidgel wurden 100μg Gesamtprotein aufgetragen und anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion des IE2-Proteins erfolgte durch den polyklonalen α-IE2 Ak (N-terminal) nach Chemilumineszenz-Färbung des sekundären HRP-gekoppelten Ak mit dem ECLplus Western Blotting Detection Reagenz. n.i., nicht infiziert; WT.BAC, mCMV-WT.BAC; ΔIE2DTR, mCMV_ΔIE2DTR; IE1L176A_ΔIE2DTR, mCMV-IE1L176A_ΔIE2DTR; ΔIE2DTR-HA, mCMV_ΔIE2DTR-HA.

3.5.4 Bestimmung des Genom-zu-PFU-Verhältnisses

Das Genom-zu-PFU-Verhältnis gibt die Zahl der Genome an, die für die Bildung eines Plaques auf MEF in Zellkultur benötigt werden und entsprechen somit einer PFU. Zusätzlich gibt das Genom-zu-PFU-Verhältnis Aufschluss über die Infektiosität der Rekombinanten, da die Plaquebildung über mehrere Infektionsrunden erfolgt. Wie von Kurz *et al.* (1997) beschrieben, beträgt das Genom-zu-PFU-Verhältnis für mCMV-WT.Smith ~500:1.

Zur Ermittlung des Genom-zu-PFU-Verhältnisses wurde die von Simon *et al.* (2005) etablierte qPCR zur Quantifizierung des viralen Gens M55 (*gB*) verwendet. Die Quantifizierung erfolgte durch eine SYBR-Green *TaqMan*-PCR (s. 2.4.14) mit dem *Primer*-Paar LC-*gB*-for und LC-*gB*-rev (s. Tab. 2.13). Dazu wurde die virale DNA aufgereinigt (s. 2.4.4.7) und in \log_{10} -Stufen titriert. Anschließend wurde die Zahl der viralen Genome in den einzelnen Verdünnungsstufen in Triplikaten bestimmt, die einer bestimmten PFU-Zahl zugewiesen werden konnten. Das zuvor mit *Sma*I linearisierte Plasmid pDrive-*gB*-PTHrP-BAC (Lemmermann *et al.*, 2010) diente bei der absoluten Quantifizierung als externer Standard. In Tab. 3.2 sind die Genom-zu-PFU-Verhältnisse der rekombinanten Viren und der WT-Stämme dargestellt. Wie zu sehen ist, unterscheiden sich die Mutanten lediglich um Faktor 2 bis 3 zum WT.

Tab. 3.2: Genom-zu-PFU-Verhältnis der verwendeten Viren

getestete Viren	Virustiter (PFU/ml)	Genome/PFU (Triplikate)	Genome/PFU (Mittelwerte)
WT.Smith	$1,13 \times 10^9$	235/345/251	277
WT.BAC	$1,34 \times 10^9$	199/262/217	226
Δ IE2DTR	$9,6 \times 10^7$	813/778/681	757
IE1L176A_ Δ IE2DTR	$1,05 \times 10^8$	899/873/905	892
Δ IE2DTR-HA	$3,1 \times 10^8$	513/500/427	480

WT.BAC, mCMV-WT.BAC; Δ IE2DTR, mCMV_ Δ IE2DTR; IE1L176A_ Δ IE2DTR, mCMV-IE1L176A_ Δ IE2DTR, Δ IE2DTR-HA, mCMV_ Δ IE2DTR-HA.

3.5.5 *In vitro*-Replikationskinetik rekombinanter Viren

Bevor die rekombinanten Viren in Tierversuchen verwendet werden können, müssen sie zuerst in Zellkultur auf ihre replikative Fitness getestet werden. Die Virusmutanten dürfen sich in ihrem Wachstum nicht vom mCMV-WT.BAC unterscheiden. Es gilt, einen potentiellen negativen Einfluss insertierter Gensequenzen auf die Replikation des Virus auszuschließen. Dazu wurden MEF zentrifugal mit einer MOI=0,4 mit mCMV-WT.BAC bzw. den rekombinanten Viren mCMV_ Δ IE2DTR und mCMV-IE1L176A_ Δ IE2DTR infiziert und über einen Zeitraum von 72h die viralen Genome zu definierten Zeitpunkten quantifiziert (s. Abb. 3.21-A). Dies erfolgte mittels qPCR (s. 2.4.14) mit M55- (*gB*) spezifischen *Primern* und einer Normalisierung auf 1×10^6 Zellen durch das zelluläre Gen *pthrp*. Zusätzlich wurde die Virusreplikation durch Bestimmung des Virustiters aus den Zellkulturüberständen mittels Plaque-Assay (s. 2.3.4) analysiert (s. Abb. 3.21-B).

Das *in vitro*-Wachstum der rekombinanten DTR-Mutanten ist, wie in Abb. 3.21 zu sehen, im Vergleich zu mCMV-WT.BAC identisch. Die Mutanten weisen keinerlei Attenuierungen hinsichtlich ihrer *in vitro*-Infektiosität auf. Die insertierte *DTR*-Sequenz hat demnach keinen negativen Einfluß auf das Viruswachstum. 16h nach der Infektion ist, gleich zum mCMV-WT.BAC, ein Anstieg der viralen Genome zu erkennen (in Abb. 3.21-A grau unterlegt), der den Beginn der viralen DNA-Replikation markiert. Der Virustiter (s. Abb. 3.21-B) zeigt erst nach 24h einen Anstieg der PFU aus den Überständen, der auf die Freisetzung der Viren aus der Zelle nach ungefähr 24h zurückzuführen ist (in Abb. 3.21-B grau unterlegt).

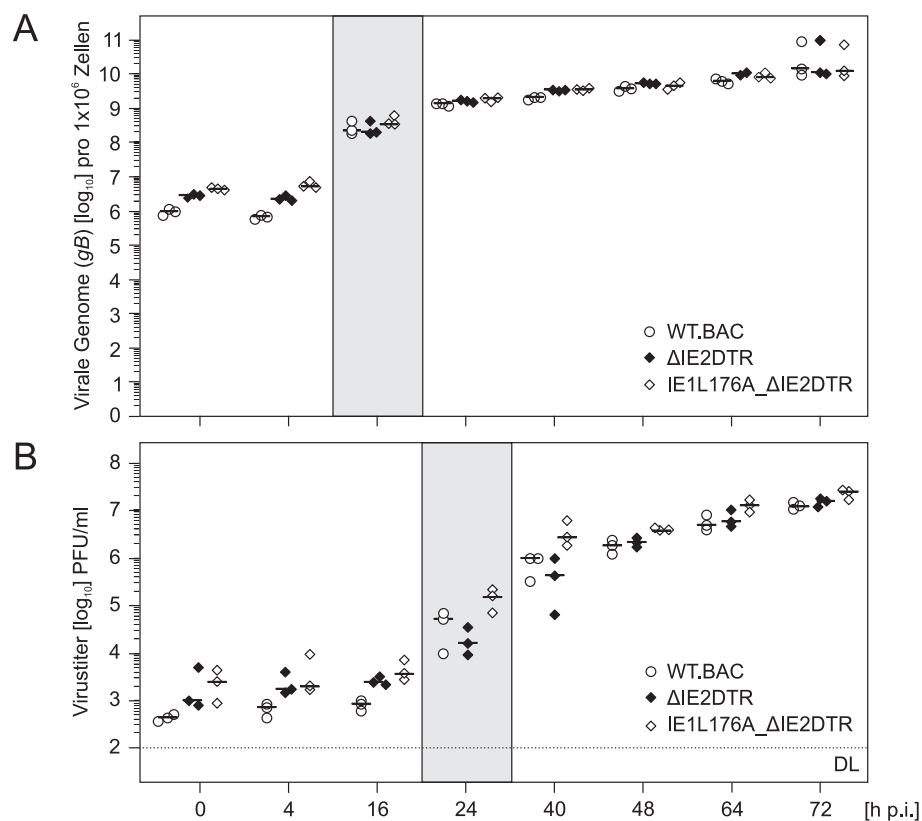


Abb. 3.21: *In vitro*-replikative Fitness der DTR-Mutanten. MEF wurden zentrifugal mit einer $MOI=0,4$ mit mCMV-WT.BAC (WT.BAC) und den DTR-Mutanten mCMV_ Δ IE2DTR (Δ IE2DTR) und mCMV-IE1L176A_ Δ IE2DTR (IE1L176A_ Δ IE2DTR) infiziert. A) Quantifizierung viraler Genome infizierter Zellen durch M55- (gB) spezifische qPCR und Normalisierung auf das zelluläre *pthrp*-Gen. B) Quantifizierung von infektiösem Virus im Zellkulturüberstand mittels Plaque-Assay. Gezeigt sind die *multistep*-Wachstumskurven über einen Zeitraum von 72h nach der Infektion. Der Zeitpunkt $t=0$ definiert den Beginn der zentrifugalen Infektion. Dargestellt sind je drei *6-well*-Kulturen pro Zeitpunkt. Der Median ist markiert durch horizontale schwarze Balken. Die grau unterlegten Zeitpunkte geben den Beginn der viralen DNA-Replikation 16h nach der Infektion an, bzw. die Virusfreisetzung 24h nach der Infektion. DL, Detektionslimit.

3.5.6 Funktioneller Nachweis des DTR

Nachdem die Expression des DTR-Proteins durch eine Western Blot-Analyse nachgewiesen wurde und gezeigt werden konnte, dass die Insertion des *DTR*-Gens keinen Einfluss auf die Virusreplikation in Zellkultur aufweist, sollte die Funktionalität des DTR verifiziert werden. Da durch eine Ak-Färbung kein direkter Nachweis des DTR-Proteins an der Zelloberfläche erbracht werden konnte, musste dessen Nachweis indirekt durch dessen Funktionalität bewiesen werden. Zur Klärung der Frage, wann und in welcher Konzentration die Zellen mit DT behandelt werden müssen, um die Virusreplikation zu verhindern, folgten mehrere aufeinander aufbauende Experimente.

3.5.6.1 Dosis-Wirkungs-Kurve für DT auf MEF

Um mit mCMV_ΔIE2DTR infizierte Zellen mit DT auslöschen zu können, musste eine DT-Konzentration gefunden werden, die es ermöglicht, die Virusreplikation zu verhindern, ohne dass auch nicht infizierte Zellen durch das Toxin *per se* sterben. Der simian DTR und der humane DTR sind in ihrer Affinität zu DT durch die 97%-ige Sequenzhomologie sehr ähnlich (Abraham *et al.*, 1993). Aufgrund dessen konnten wir Arbeiten von Chang *et al.* (1989) als Grundlage für die DT-Konzentration in Zellkultur verwenden. Bei einer DT-Konzentration von 7,5ng/ml wurde die Proteinsynthese in humanen U937 Zellen, die den hoch DT-affinen humanen DTR exprimieren, um 50% gehemmt. Für unseren Versuch zur Ermittlung der optimalen DT-Konzentration auf MEF, die durch die Virusinfektion den hoch DT-affinen simian DTR exprimieren, wählten wir daher einen Konzentrationsbereich für DT von 0,01ng/ml bis 1μg/ml Endkonzentration. Da wir vermuteten, dass das DT durch seine Halbwertszeit in der Zelle von ungefähr 2h bis 5h (Yamaizumi *et al.*, 1982) nicht lange stabil ist, wählten wir als Zeitpunkt der DT-Gabe 6h nach der Infektion, um sicher zu stellen, dass der DTR bereits an der Oberfläche exprimiert ist, sobald das DT verfügbar ist.

Zur Ermittlung der optimalen DT-Konzentration *in vitro* wurden MEF in 6-well-Kulturen mit einer MOI=0,4 mit den Virusmutanten mCMV_ΔIE2DTR und mCMV-IE1L176A_ΔIE2DTR und als Kontrolle mit mCMV-WT.BAC zentrifugal infiziert und 6h nach der Infektion mit den angegebenen DT-Konzentrationen (s. Abb. 3.22) behandelt. 12h und 24h nach der Infektion wurden die Zellen geerntet und die DNA daraus isoliert, um mittels M55- (*gB*) spezifischer qPCR die Anzahl der viralen Genome in den Zellen zu bestimmen (s. 2.4.14). Diese Zeitpunkte wurden gewählt, da 12h nach der Infektion noch keine Virusreplikation stattgefunden hat. Dagegen wurde bereits nach 24h eine Replikationsrunde des Virus durchlaufen und es sollte damit erkennbar sein, ab welcher DT-Konzentration die Virusreplikation gehemmt wurde.

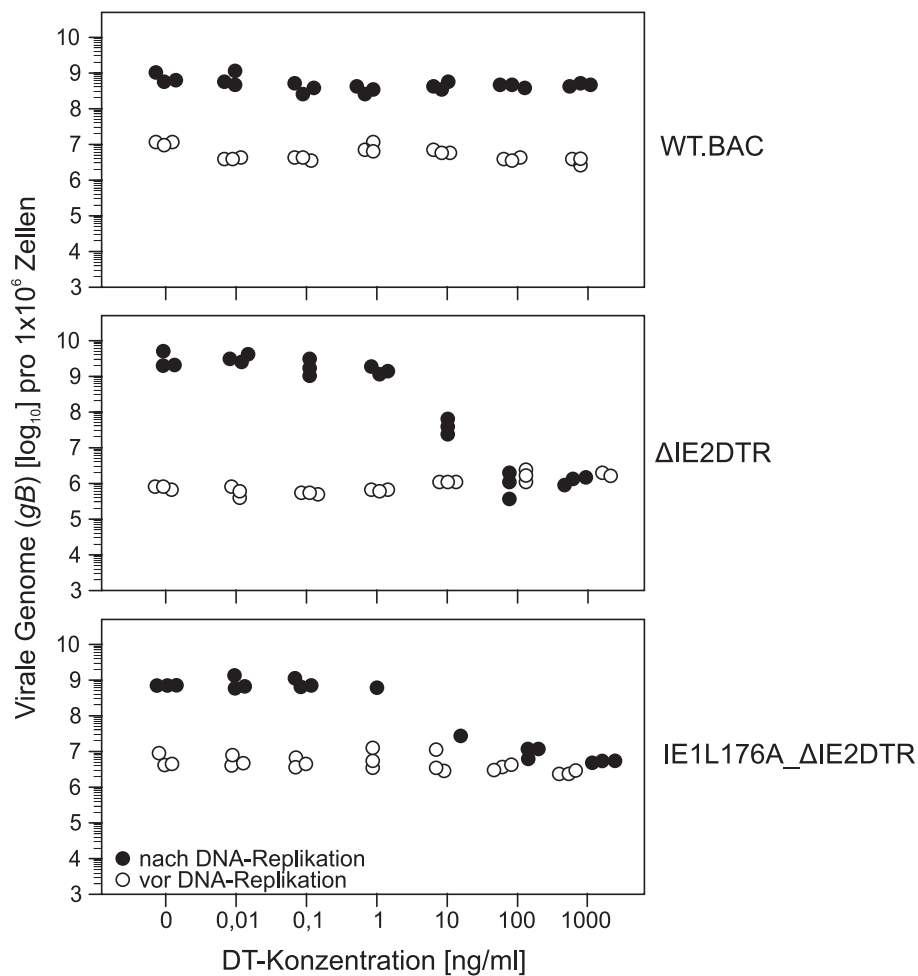


Abb. 3.22: DT Dosis-Wirkungs-Kurve für mCMV_ΔIE2DTR und mCMV-IE1L176A_ΔIE2DTR infizierte MEF. MEF wurden mit einer MOI=0,4 mit mCMV-WT.BAC (WT.BAC) bzw. den rekombinanten Viren mCMV_ΔIE2DTR (ΔIE2DTR) und mCMV-IE1L176A_ΔIE2DTR (IE1L176A_ΔIE2DTR) zentrifugal infiziert. Gezeigt ist die Quantifizierung viraler Genome infizierter Zellen durch M55- (*gB*) spezifische qPCR und Normalisierung auf das zelluläre *pthrp*-Gen. Die Werte beziehen sich auf 1×10^6 Zellen. Der Zeitpunkt $t=0$ definiert den Beginn der zentrifugalen Infektion. 6h nach der Infektion wurde DT in verschiedenen Endkonzentrationen (kein DT; 0,01ng/ml bis 1000ng/ml) zu den Zellen gegeben. Die Zahl der viralen Genome wurde sowohl vor der viralen DNA-Replikation, 12h nach der Infektion (weiße Kreise) als auch nach der viralen DNA-Replikation, 24h nach der Infektion (schwarze Kreise) bestimmt. Es sind Werte von je drei 6-well-Kulturen pro Zeitpunkt angegeben. Bei einer Konzentration von 1ng/ml DT und 10ng/ml DT ist für mCMV-IE1L176A_ΔIE2DTR infizierte MEF jeweils nur ein Wert angegeben, da keine Zellen geerntet werden konnten.

Bei einer DT-Konzentration von 100ng/ml ist 24h nach der Infektion mit den DTR-Rekombinanten kein Anstieg der viralen Genome pro 1×10^6 Zellen nachweisbar (s. Abb. 3.22). Dies bedeutet, dass bei 100ng/ml DT die Virusreplikation in mCMV_ΔIE2DTR und mCMV-IE1L176A_ΔIE2DTR infizierten Zellen durch DT völlig gehemmt wurde. Bei mCMV-WT.BAC infizierten Zellen dagegen, die keinen hoch DT-affinen DTR exprimieren, war wie erwartet kein hemmender Effekt des DT auf die Virusreplikation zu sehen. Bei einer DT-Konzentration von

10ng/ml konnte zwar die DNA-Load mCMV_ΔIE2DTR und mCMV-IE1L176A_ΔIE2DTR infizierter Zellen um die Hälfte gesenkt werden, bei niedrigeren DT-Konzentrationen wurde die Virusreplikation der DTR-Rekombinanten jedoch nicht mehr beeinflusst. Da eine Konzentrationserhöhung auf 1μg/ml keine weitere Reduktion der viralen Genome der DTR-Rekombinanten zur Folge hatte, wurde eine DT-Konzentration von 100ng/ml als optimale Konzentration zur Verhinderung der Virusreplikation in mCMV_ΔIE2DTR infizierten MEF festgelegt.

3.5.6.2 Replikationskinetik unter DT-Gabe

Um zu ermitteln, inwieweit DT die Virusreplikation nachhaltig beeinflusst, wurde eine Replikationskinetik unter DT-Gabe durchgeführt. Hierfür wurden konfluent bewachsene MEF in 6-*well*-Kulturen zentrifugal mit den Virusmutanten mCMV_ΔIE2DTR und mCMV-IE1L176A_ΔIE2DTR und zur Kontrolle mit mCMV-WT.BAC mit einer MOI=0,4 infiziert. 6h nach der Infektion wurde DT in einer Endkonzentration von 100ng/ml (s. 3.5.6.1) zu den Zellen gegeben, die DNA aus den Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten isoliert und die Zahl der viralen Genome bestimmt (s. Abb. 3.23). Zu den gleichen Zeitpunkten wurde der Virustiter mittels Plaque-Assay aus den Zellkulturüberständen der 6-*well*-Kulturen ermittelt.

Die Ergebnisse der Ermittlung der viralen Genome, sowie des Virustiters infizierter MEF, jeweils mit und ohne DT-Behandlung sind in Abb. 3.23 dargestellt. Wie erwartet hatte das DT keinerlei negative Auswirkungen auf die Virusreplikation von mCMV-WT.BAC in Zellkultur in dem angegebenen Zeitraum. Die Anzahl der viralen Genome in den Zellen, sowie die Virustiter aus den Zellkulturüberständen waren unter DT-Gabe identisch zu den DT-unbehandelten Zellen. Bei den zwei Rekombinanten sieht man jedoch deutlich, dass durch die DT-Behandlung die Virusreplikation im Vergleich zu DT-unbehandelten Zellen gehemmt wurde und die Anzahl an viralen Genomen über die gesamte Messdauer nie über das Infektionsniveau hinaus anstieg. Das heißt, dass die DT-Gabe 6h nach der Infektion die Virusreplikation über den gemessenen Zeitraum von 60h inhibiert.

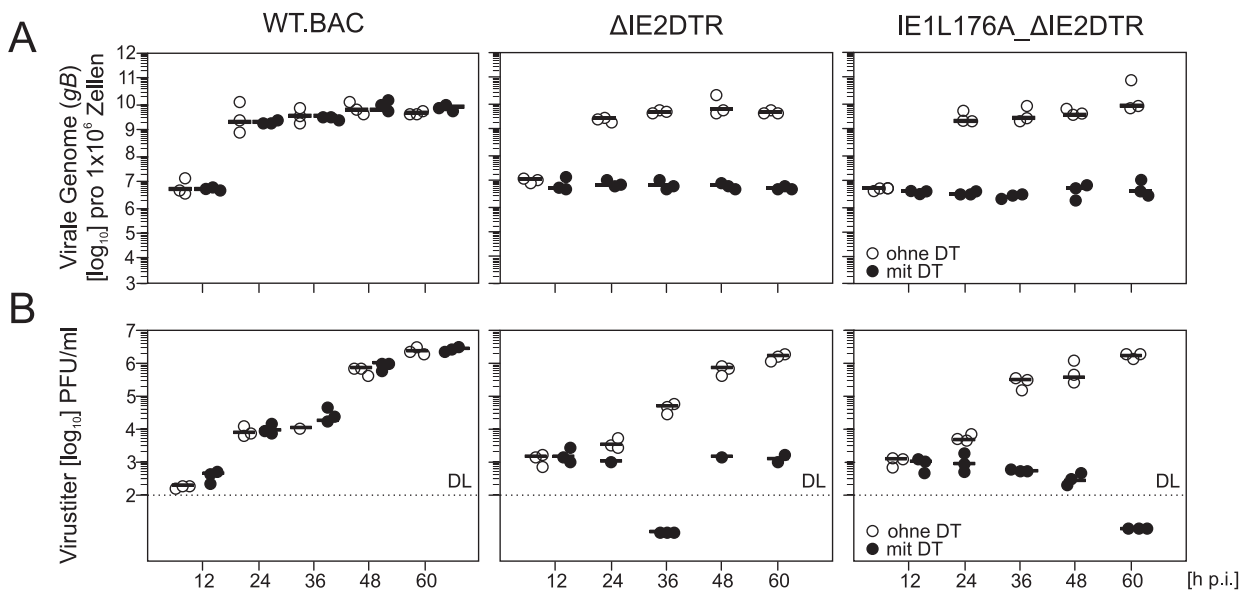


Abb. 3.23: *In vitro*-Replikationskinetik unter DT-Gabe. MEF wurden in 6-*well*-Kulturen mit einer MOI=0,4 mit mCMV-WT.BAC (WT.BAC) bzw. den Rekombinanten mCMV_ΔIE2DTR (ΔIE2DTR) und mCMV-IE1L176A_ΔIE2DTR (IE1L176A_ΔIE2DTR) zentrifugal infiziert und mit DT (schwarze Kreise) bzw. ohne DT (weiße Kreise) bis zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Infektion inkubiert. A) Gezeigt ist die Quantifizierung viraler Genome infizierter Zellen durch M55- (*gB*) spezifische qPCR und Normalisierung auf das zelluläre *pthrp*-Gen. Die Werte beziehen sich auf 1×10^6 Zellen. B) Quantifizierung von infektiösem Virus im Zellkulturüberstand mittels Plaque-Assay. Der Zeitpunkt $t=0$ definiert den Beginn der zentrifugalen Infektion. 6h nach der Infektion wurde DT mit einer Endkonzentration von 100ng/ml zu den Zellen gegeben. Über einen Zeitraum von 60h nach der Infektion wurden alle 12h der Virustiter in den Überständen und die Zahl der viralen Genome in den Zellen bestimmt. Die Kreise zeigen Werte von je drei 6-*well*-Kulturen pro Zeitpunkt, bei der Ermittlung des Virustiters konnten jedoch bei einigen Zeitpunkten nur ein bzw. zwei Kulturen ausgewertet werden, da in diesen Kulturen die Zellen tot waren. Der Median ist markiert durch horizontale schwarze Balken. DL, Detektionslimit.

3.5.6.3 DT-Stabilität in Zellkulturmedium

Um Zellen direkt zum Zeitpunkt der Infektion mit DT behandeln zu können, musste zuvor geklärt werden, ob das DT in Kulturmedium bei 37°C über mehrere Stunden stabil bleibt.

Zu 60% bis 80% konfluent bewachsene MEF wurden hierfür in 6-*well*-Kulturen mit einer MOI=4 mit mCMV_ΔIE2DTR zentrifugal infiziert und 24h mit DT in einer Endkonzentration von 100ng/ml behandelt, welches zuvor für 4h, 8h, 12h bzw. 24h bei 37°C in Medium vorinkubiert wurde (s. Abb. 3.24-A). 24h nach der Infektion und DT-Gabe wurde die Zahl der viralen Genome bestimmt (s. 2.4.14), um die Zunahme an viralen Genomen durch die Virusreplikation zu ermitteln. Zur Kontrolle wurden MEF mit dem gleichen Virus infiziert, jedoch nicht mit DT behandelt. Dabei wurde 6h und 24h nach der Infektion die virale DNA-Load bestimmt (s. 2.4.14).

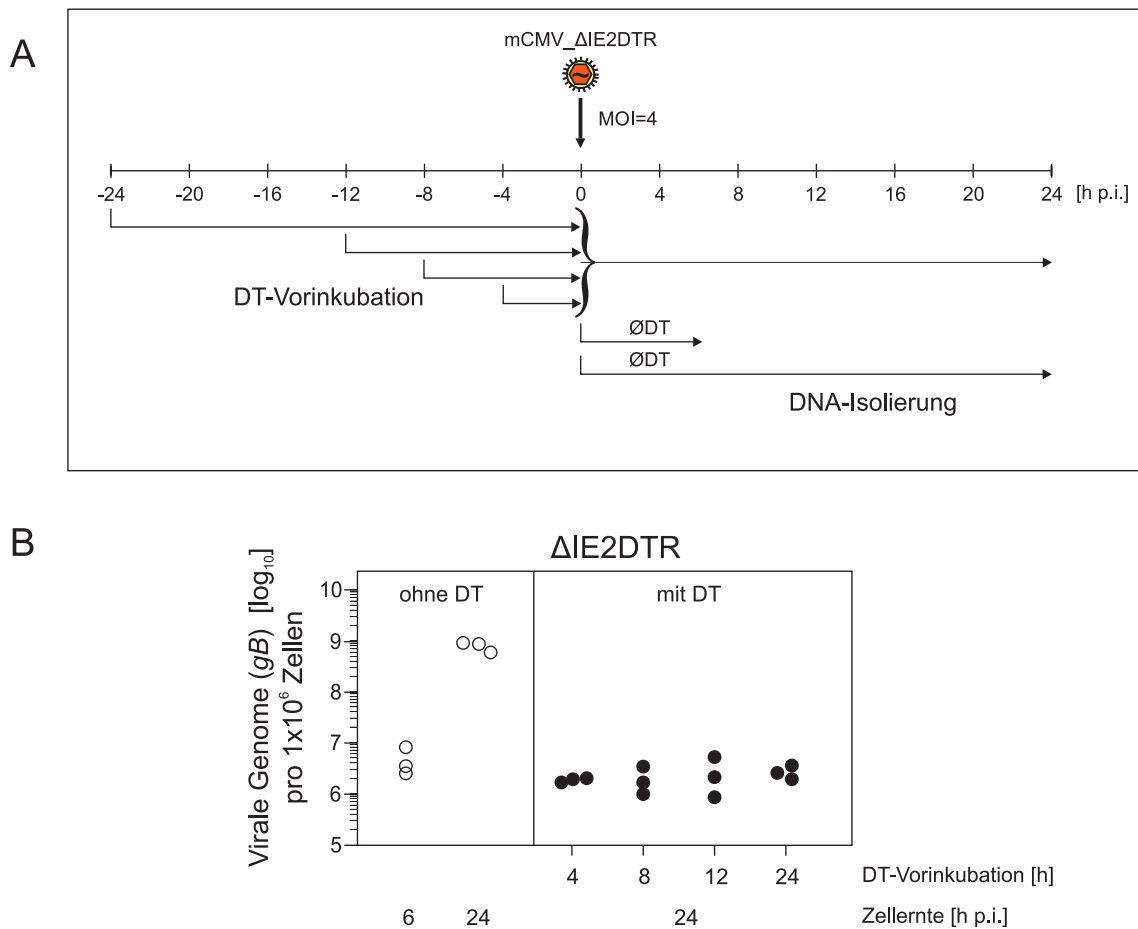


Abb. 3.24: DT-Stabilität in Kulturmedium. A) MEF wurden mit einer MOI=4 zentrifugal mit mCMV_ΔIE2DTR infiziert. Direkt mit der Infektion wurde DT in einer Endkonzentration von 100ng/ml auf die Zellen gegeben. Zuvor wurde das DT bei 37°C im Brutschrank über einen Zeitraum von 4h, 8h, 12h bzw. 24h in Kulturmedium vorinkubiert. Als Referenz dienten infizierte, DT-unbehandelte MEF. Die Zahl der viralen Genome wurde durch M55- (*gB*) spezifische qPCR bestimmt. B) Die schwarzen Kreise zeigen die mit DT-behandelten Zellen; Zellernte 24h nach Infektion und DT-Gabe. Die weißen Kreise zeigen die Referenzgruppe; Zellernte 6h und 24h nach Infektion. Die Werte beziehen sich auf 1×10^6 Zellen, normiert auf das zelluläre *pthrp*-Gen. Es sind Werte von jeweils drei 6-well-Kulturen angegeben.

Da die Zahl der viralen Genome bei den DT-behandelten Kulturen 24h nach der Infektion nicht über dem Infektionslevel (vergleiche Zeitpunkt 6h ohne DT-Behandlung) liegt, wird deutlich, dass selbst DT, das für 24h in Medium bei 37°C vorinkubiert wurde, seine Aktivität beibehält. Für alle weiteren Versuche wurde daher das DT in einer Endkonzentration von 100ng/ml direkt zum Zeitpunkt der Infektion zu den Zellen gegeben.

3.5.6.4 Hemmung der Proteinsynthese durch DT

Die Virusreplikation von mCMV_ΔIE2DTR infizierten MEF wird durch DT gehemmt. Um die Frage zu klären, ob auf Transkriptions- oder Translationsebene die Virusreplikation unter DT-Gabe inhibiert wird, wurden *IE*-, *E*- und *L*-Transkripte mCMV_ΔIE2DTR infizierter MEF mit und ohne DT-Behandlung mittels RT-qPCR (s. 2.4.15.1) quantifiziert. Des Weiteren wurde die Expression der jeweiligen Proteine in infizierten MEF zu verschiedenen Zeitpunkten mit und ohne DT-Behandlung untersucht.

Zur relativen Quantifizierung der viralen Transkripte wurden für jeden Zeitpunkt zwei Replikate von 6-*well*-Kulturen mit einer MOI=4 mit der Rekombinanten mCMV_ΔIE2DTR unter gleichzeitiger Zugabe von 100ng/ml DT infiziert, sowie je zwei Replikate in Abwesenheit von DT. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Infektion (s. Abb. 3.25) wurden die Zellen geerntet und daraus die RNA isoliert. Aus je 100ng RNA wurde die Zahl der viralen Transkripte der DT-behandelten und der DT-unbehandelten Gruppe miteinander verglichen (s. Abb. 3.25). Als endogene Kontrolle wurden zur Normierung die Transkripte für das zelluläre Gen *gapdh* bestimmt. Für das *ie1*-Gen wird in Abb. 3.25 sehr deutlich, dass die Anzahl an viralen Transkripten zu allen getesteten Zeitpunkten mit und ohne DT-Behandlung gleich bleibt. Bei den E-Genen *e1* und *m164* sind 4h und 8h nach Infektion ebenfalls keine Unterschiede in der Zahl der viralen Transkripte zwischen DT-behandelten Zellen und DT-unbehandelten Zellen zu sehen. Ausschließlich 24h nach Infektion und DT-Gabe ist die Anzahl an *E1*- und *m164*-Transkripten leicht erniedrigt im Vergleich zur Anzahl an Transkripten in DT-unbehandelten infizierten Zellen. Die L-Gene *M55* (*gB*) und *M86* (*MCP*) zeigen 24h nach Infektion und DT-Gabe eine wesentlich stärkere Abnahme an *M55*- (*gB*) und *M86*- (*MCP*) Transkripten, während 4h und 8h nach Infektion die Zahl der Transkripte in DT-behandelten Zellen annähernd gleich den DT-unbehandelten Zellen ist.

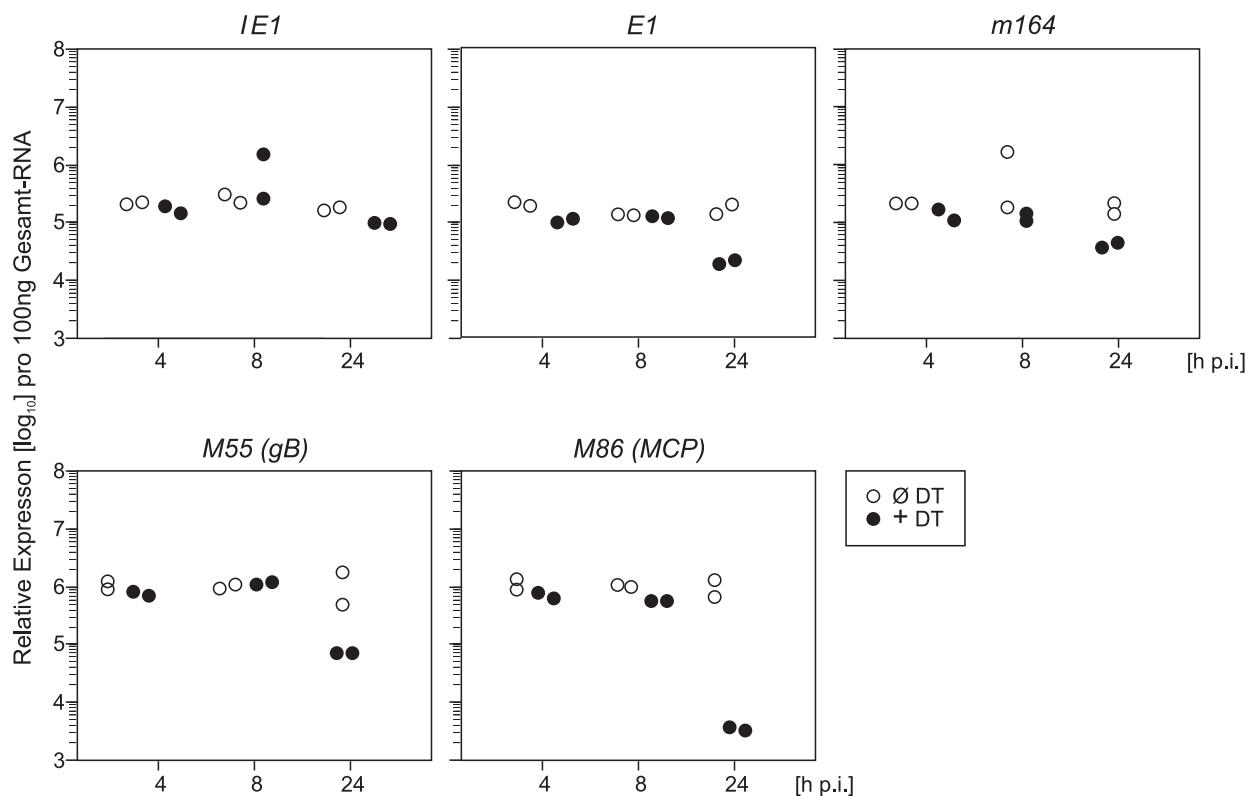


Abb. 3.25: Virale Transkripte infizierter MEF in An- und Abwesenheit von DT.

MEF wurden zentrifugal mit einer MOI=4 mit der Rekombinanten mCMV_ΔIE2DTR infiziert. Zwei Replikate wurden mit DT in einer Konzentration von 100ng/ml behandelt (schwarze Kreise), zwei Replikate wurden ohne DT inkubiert (weiße Kreise). Gezeigt ist die relative Quantifizierung verschiedener viraler Transkripte aus 100ng isolierter Gesamt-RNA der DT-behandelten Kulturen im Vergleich mit DT-unbehandelten Kulturen. Die Anzahl der viralen Transkripte für das *ie1*-, *e1*-, *m164*-, *M55*- (*gB*) und das *M86*- (*MCP*) Gen wurden auf die Zahl der *GAPDH*-Transkripte normiert. Gezeigt sind die Zeitpunkte 4h, 8h und 24h nach Infektion.

Die Wirkung von DT ist auf die Hemmung der Translation durch die ADP-Ribosylierung des EF2 zurückzuführen (Collier, 1975; Chung und Collier, 1977). Durch Western Blot-Analysen sollte gezeigt werden, zu welchem Zeitpunkt des viralen Replikationszyklus die Hemmung der viralen Proteinsynthese einsetzt. Konfluent bewachsene MEF wurden in einer 10cm-Zellkulturschale mit einer MOI=4 mit der Rekombinanten mCMV_ΔIE2DTR zentrifugal infiziert und direkt zum Zeitpunkt der Infektion mit 100ng/ml DT behandelt bzw. ohne DT behandelt. 4h, 8h und 24h nach der Infektion wurden die Zellen geerntet und je 30μg Gesamtzellprotein aus Zelllysaten in einer Western Blot-Analyse auf das Vorhandensein verschiedener viraler Proteine untersucht. Es wurden Ak zur Detektion der Proteine *IE1*, *E1*, *m164*, *M55 (gB)* und *M86 (MCP)* eingesetzt.

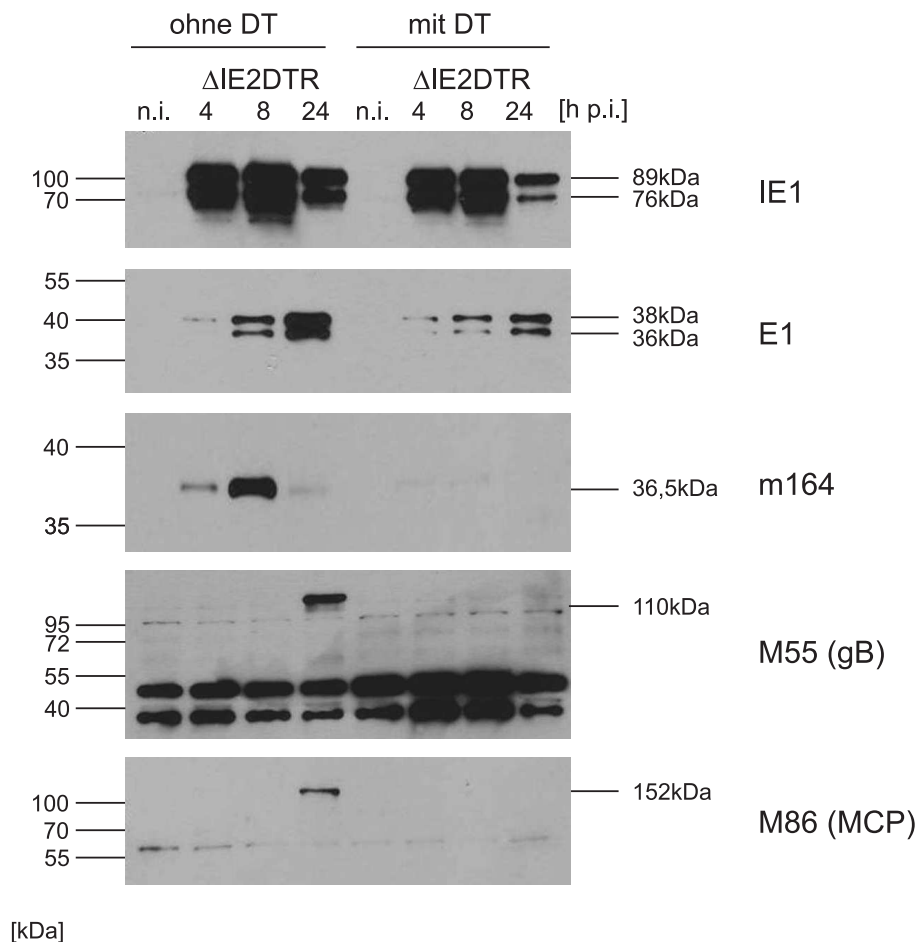


Abb. 3.26: Expression verschiedener viraler Proteine in An- und Abwesenheit von DT. Western Blot-Analyse für die viralen Proteine IE1, E1, m164, M55 (gB) und M86 (MCP) von Gesamtzelllysaten von mCMV_ΔIE2DTR zentrifugal infizierten MEF (MOI=4) zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion. Der Zeitpunkt $t=0$ definiert den Start der Zentrifugation und der Behandlung mit 100ng/ml DT. Die Auftrennung von 30μg Gesamtzellprotein je Spur erfolgte in einem 12,5%-igen SDS-Polyacrylamidgel. Die Detektion der auf eine PVDF-Membran transferierten Proteine erfolgte durch die jeweiligen Ak gegen die viralen Proteine und nach Visualisierung der Ak-Bindung durch die HRP-gekoppelten Ak und Chemilumineszenz-Färbung mittels ECLplus Western Blotting Reagenz. n.i., nicht infiziert; ΔIE2DTR, mCMV_ΔIE2DTR.

Die Proteine IE1 und E1 sind sowohl in Anwesenheit, als auch in Abwesenheit von DT über den getesteten Zeitraum bis 24h nach der Infektion deutlich detektierbar (s. Abb. 3.26). In diesem Versuch konnte der größte Anteil an IE1-Protein mit und ohne DT-Behandlung 8h nach der Infektion nachgewiesen werden, bei dem E1-Protein 24h nach Infektion. Es wird deutlich, dass eine Hemmung des IE1- bzw. E1-Proteins unter DT-Behandlung lediglich 24h nach Infektion zu beobachten ist; die früheren Zeitpunkte zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen DT-behandelten und DT-unbehandelten infizierten Zellen. Die Hemmung der Translation durch DT setzt demnach erst nach der Translation der *IE*-Transkripte ein, obwohl das *DTR*-Gen unter *IE*-Bedingungen exprimiert wird. Es wird jedoch Zeit benötigt, bis der DTR an der Oberfläche präsentiert wird. Signifikant wird die Hemmung der Translation durch DT bei den getesteten

Proteinen m164, M55 (gB) und M86 (MCP). m164 zeigt in Abwesenheit von DT die stärkste Expression 8h nach der Infektion, M55 (gB) und M86 (MCP) sind erst 24h nach der Infektion detektierbar. Unter DT-Behandlung ist 8h nach der Infektion keinerlei m164-Protein nachweisbar, sowie kein M55 (gB) und M86 (MCP) 24h nach der Infektion zu detektieren ist. Dies bedeutet, dass das Virus durch die DT-Behandlung bestimmte *E*-Proteine, sowie essentielle Struktur-Proteine wie M55 (gB) und M86 (MCP) nicht mehr translatieren kann, die in der L-Phase, im Falle von M55 (gB) und M86 (MCP), für den Zusammenbau des Virions benötigt werden. IE1 und E1 werden dagegen in ausreichender Menge translatiert, bevor das DT wirken kann.

3.5.6.5 Nachweis der DT-induzierten Apoptose

Durch Blockierung des EF2 wird nicht nur die Translation der viralen Proteine, sondern auch die der zellulären Proteine gehemmt, wodurch die Zelle apoptotisch wird (Kato und Pappenheimer, 1960). Um dies auch in unseren Versuchen bestätigen zu können, wurden MEF mit einer MOI=4 mit mCMV_ΔIE2DTR bzw. mit mCMV-WT.BAC zentrifugal infiziert. Die infizierten MEF wurden direkt zum Zeitpunkt der Infektion mit DT in einer Endkonzentration von 100ng/ml behandelt. Als Kontrolle dienten mit mCMV_ΔIE2DTR infizierte, DT-unbehandelte Zellen. Über einen Zeitraum von 40h nach der Infektion wurden alle 5h Bilder der Zellkultur im Phasenkontrast aufgenommen (s. Abb. 3.27).

Bis 15h nach der Infektion konnte bei keinen der gezeigten infizierten MEF ein cytopathischer Effekt des mCMV im Vergleich mit nicht infizierten Zellen identifiziert werden, sowohl mit DT-Behandlung als auch ohne DT, da sich das Virus noch nicht vermehrt hatte und die Zelle nicht lysieren konnte. Nach 20h bis 25h jedoch wurde deutlich, dass mCMV-WT.BAC infizierte Zellen, die mit DT behandelt wurden (s. Abb. 3.27-C), und mCMV_ΔIE2DTR infizierte Zellen ohne DT (s. Abb. 3.27-A) einen deutlichen cytopathischen Effekt aufgrund der mCMV-Infektion zeigten. Die Zellen begannen sich abzukugeln. Da sich mCMV-WT.BAC infizierte Zellen ohne DT-Behandlung nicht von mCMV_ΔIE2DTR infizierten Zellen ohne DT (s. Abb. 3.27-A) unterscheiden, wurden sie in Abb. 3.27 nicht aufgeführt. mCMV_ΔIE2DTR infizierte Zellen, die mit DT behandelt wurden (s. Abb. 3.27-B), zeigten dagegen keinerlei Zellabkuglung 20h nach Infektion. Im weiteren Verlauf der DT-Inkubation ist bei dieser Gruppe ebenfalls kein cytopathischer Effekt der Zellabkuglung zu erkennen. Dies bestätigt, dass die DT-Behandlung die Virusvermehrung inhibiert und somit die Zelle zu Beginn der Infektion vor dem Virus *per se* schützt. Dagegen sind ab 30h nach der Infektion charakteristische Zeichen einer eintretenden Apoptose zu erkennen, wie beispielsweise das Schrumpfen des Cytoplasmas und Kontraktion der Plasmamembran.

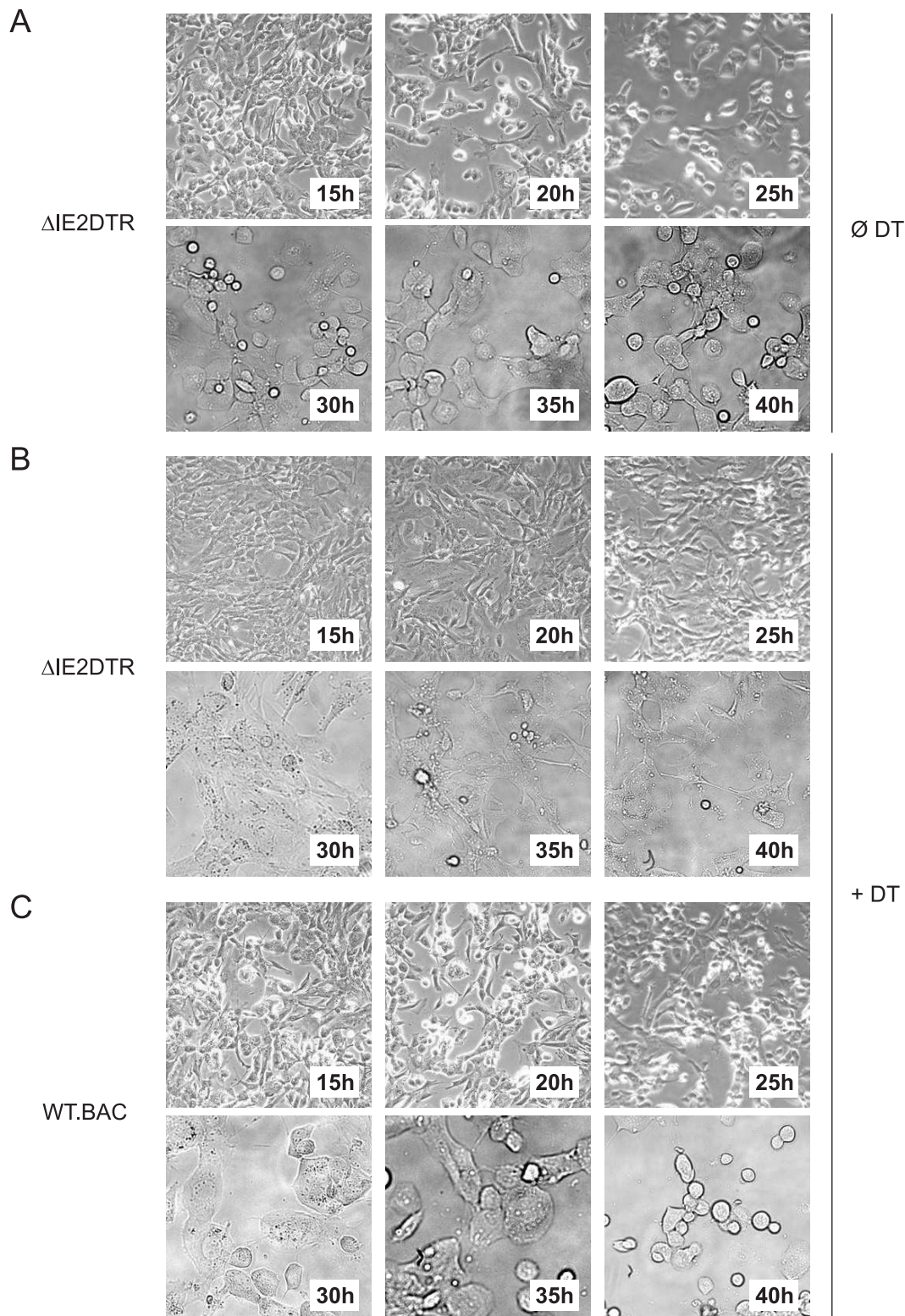


Abb. 3.27: Mikroskopischer Nachweis der DT-induzierten Apoptose von mCMV_ Δ IE2DTR infizierten MEF im Vergleich zu mCMV-WT.BAC. Die morphologischen Veränderungen der mCMV_ Δ IE2DTR bzw. mCMV-WT.BAC infizierten MEF in 6-well-Zellkulturplatten wurden mikroskopisch im Phasenkontrast dokumentiert. Gezeigt ist eine Kinetik von 15h, 20h, 25h, 30h, 35h und 40h Inkubation von A) mCMV_ Δ IE2DTR infizierten Zellen in Abwesenheit von DT, in B) mCMV_ Δ IE2DTR infizierten Zellen in Anwesenheit von DT und C) mCMV-WT.BAC infizierte MEF in Anwesenheit von DT. Die DT-Behandlung erfolgte ab dem Zeitpunkt $t=0$, welcher den Beginn der zentrifugalen Infektion definiert.

Die morphologischen Veränderungen der Zellen im Phasenkontrastbild, welche auf Apoptose hinweisen, sollten durch FACS-Analysen bestätigt werden. MEF wurden mit einer MOI=4 mit der Mutante mCMV_ΔIE2DTR bzw. mCMV-WT.BAC in einer zu 60% bis 80% konfluent bewachsenen 10cm-Zellkulturschale zentrifugal infiziert und mit DT der Endkonzentration 100ng/ml behandelt. 45h nach der Infektion wurden sowohl die Zellen im Zellkulturüberstand, als auch die adhärenen Zellen geerntet und mit Annexin V und 7-AAD gefärbt.

Die Zellen wurden zunächst mit dem α -H-2K^d-Ak gefärbt, um infizierte Zellen von nicht infizierten Zellen unterscheiden zu können. Der verwendete Ak markiert die MHC Klasse I-Moleküle auf der Oberfläche der Zelle. Ist eine Zelle mit mCMV infiziert, wird die Präsentation der Klasse I-Moleküle durch die Immunevasion des Virus herunter reguliert und es können zwei Populationen unterschieden werden, die H-2K^{d-}, infizierte Population, und die vermutlich nicht infizierten H-2K^{d+} Zellen. Insgesamt wurden 50.000 Zellen gemessen. Der Nachweis der apoptotischen Zellen erfolgte sowohl in der H-2K^{d-}, als auch in der H-2K^{d+} Population, die bei der Auswertung des prozentualen Anteils apoptotischer Zellen jeweils als 100% angesehen werden. Die FACS-Analyse zeigt deutlich, dass Apoptose lediglich in mCMV_ΔIE2DTR infizierten Zellen in Anwesenheit von DT induziert werden konnte (s. Abb. 3.28-A). 22,3% der H-2K^{d-} Zellen sind Annexin V-positiv, d.h. sie haben das PS zur äußeren Seite der Plasmamembran translokiert, und können nicht durch 7-AAD, einem Marker für nekrotische Zellen, angefärbt werden (in Abb. 3.28-A links rot umrandet). In mCMV-WT.BAC infizierten MEF konnten sowohl mit, als auch ohne DT, apoptotische Zellen nur in geringem Maße von ungefähr 3% bis 4% detektiert werden.

Schlussfolgerung:

Durch Western Blot-Analysen konnte sowohl die Expression des DTR-Proteins unter IE-Bedingungen verifiziert werden, als auch die Bildung eines DTR-IE2-Fusionsproteins ausgeschlossen werden. Die *in vitro*-Replikation und Infektiosität aller mCMV-Rekombinanten sind im Vergleich zum mCMV-WT.BAC nicht verändert. Durch Zugabe von DT mit einer Endkonzentration von 100ng/ml kann die Replikation der rekombinanten Viren in Zellkultur verhindert werden und damit die Funktionalität des DTR verifiziert werden. In mCMV_ΔIE2DTR bzw. mCMV-IE1L176A_ΔIE2DTR infizierten Zellen wird Apoptose ausschließlich durch DT induziert, wodurch keine neuen Viruspartikel entlassen werden, die die Nachbarzellen infizieren könnten. Eine DT-Behandlung kann wie erwartet keine Apoptose in mCMV-WT.BAC infizierte Zellen auslösen.

3.6 Charakterisierung der rekombinanten Viren *in vivo*

Die bisherigen Zellkulturversuche haben gezeigt, dass sich die Insertion des *DTR*-Gens nicht negativ auf die *in vitro*-Infektiosität der Virusmutanten auswirkt. Da sich das Virus *in vivo* jedoch völlig anders verhalten kann, war es notwendig zu zeigen, dass die Mutation auf die sogenannte „replikative Fitness“, d.h. die *in vivo*-Replikation der Viren, keinen Einfluss hat. Es sollte deshalb in der Maus untersucht werden, ob es nach der Infektion zu einer Attenuierung des Virus aufgrund des eingebrachten *DTR*-Gens kommt.

Da die mCMV-Infektion im immunkompetenten Tier vom Immunsystem effektiv kontrolliert wird (zur Übersicht: Krmpotic *et al.*, 2003), wurde die *in vivo*-Replikation im immundepletierten Tier verfolgt. Die Replikationskinetik wurde in 8 bis 10 Wochen alten BALB/c-Mäusen durchgeführt, die nach γ -Bestrahlung (7Gy) i.f. mit 1×10^5 PFU mCMV-WT.BAC, mCMV-WT.Smith bzw. den Virusrekombinanten mCMV_ΔIE2DTR und mCMV-IE1L176A_ΔIE2DTR infiziert wurden. Da die mCMV-Infektion polytrop ist, d.h. verschiedene Zelltypen zur produktiven Infektion beitragen, die so unter Immunsuppression zu einer Multiorganerkrankung führen, wurde die Replikation der Viren in verschiedenen Organen wie Lunge, Milz und Speicheldrüse mittels Plaque-Assay *in vitro* und mit einer IE1-spezifischen IHC in der Leber *in situ* zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert.

Die Organtiter einzelner Tiere können, v.a. nach hämatoablativer Behandlung durch γ -Bestrahlung, begründet durch stochastische Genotoxizität der Bestrahlung, erheblich um einen Faktor von 10^1 bis 10^2 variieren (Reddehase *et al.*, 1985), selbst wenn Alter und Geschlecht identisch sind. Um trotz der Varianzen in den Virustitern eine Analyse durchführen zu können, wurden Gruppengrößen von mindestens drei Tieren pro Zeitpunkt analysiert. Der Versuchsverlauf der *in vivo*-Charakterisierung der getesteten Viren ist in Abb. 3.29 dargestellt.

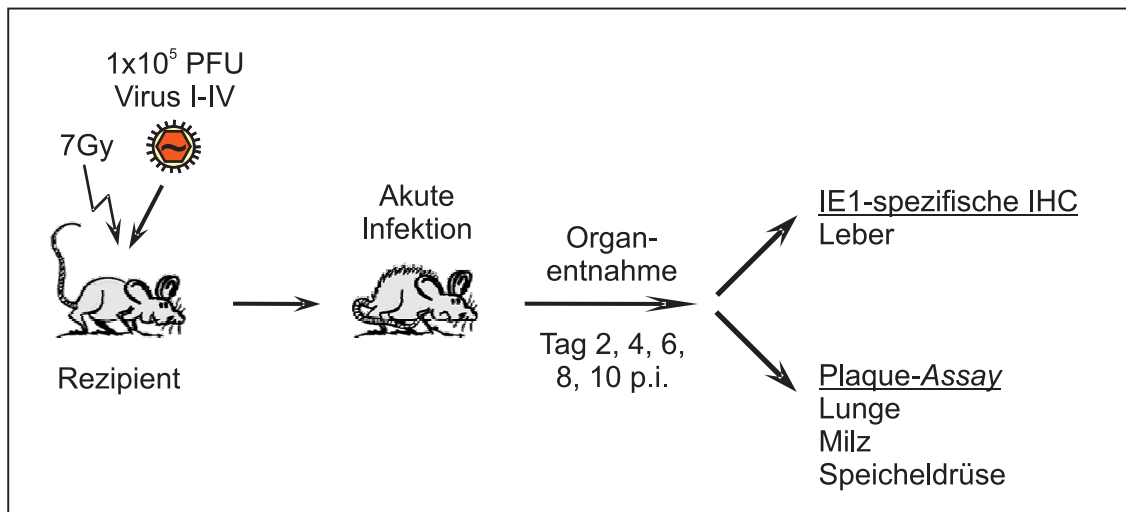


Abb. 3.29: Modell zur Untersuchung der *in vivo*-Replikation der mCMV-DTR-Mutanten. 8 bis 10 Wochen alte BALB/c-Mäuse wurden mit 7Gy bestrahlt und anschließend mit 1×10^5 PFU mCMV-WT.Smith (I), mCMV-WT.BAC (II), mCMV_ Δ IE2DTR (III) und mCMV-IE1L176A_ Δ IE2DTR (IV) infiziert. An Tag 2, 4, 6, 8 und 10 nach der Infektion wurden von je drei Tieren pro Virus Lunge, Milz und Speicheldrüse zur Ermittlung des Virustiters mittels Plaque-Assay entnommen. Die Zahl der infizierten Zellen in der Leber wurde durch eine IE1-spezifische IHC ermittelt.

3.6.1 Quantifizierung der Virusreplikation in Lunge, Milz und Speicheldrüse mittels Plaque-Assay

Infektiöse Partikel können durch den cytopathischen Effekt (Lyse) infizierter, permissiver Zellen *in vitro* durch den Plaque-Assay nachgewiesen werden. Mit dieser klassischen Nachweismethode kann die Infektiosität bzw. der Titer aus Zellkulturüberständen, Blut oder wie hier aus Organhomogenaten bestimmt werden. Ein Vergleich der viralen Organtiter mCMV-WT.BAC bzw. mCMV-WT.Smith infizierter Tiere mit Tieren, die mit den DTR-Rekombinanten infiziert wurden, lässt Rückschlüsse auf eine mögliche Attenuierung der Viren zu.

Um zu überprüfen, ob die Insertion des *DTR*-Gens einen Einfluss auf die *in vivo*-Replikation hat, wurden immundepletierte BALB/c-Mäuse mit den zwei WT-Stämmen mCMV-WT.BAC und mCMV-WT.Smith, sowie mit den Virusmutanten mCMV_ Δ IE2DTR und mCMV-IE1L176A_ Δ IE2DTR i.f. mit 1×10^5 PFU infiziert. 2, 4, 6, 8 und 10 Tage nach der Infektion wurden Lunge, Milz und Speicheldrüse von jeweils drei Tieren pro Gruppe entnommen und die Organe homogenisiert. Die Organhomogenate wurden in \log_{10} -Stufen titriert und die Organtiter im Plaque-Assay (s. 2.3.4.2) bestimmt. Das Ergebnis der *in vivo*-Replikationskinetik ist in Abb. 3.30 zusammengefasst dargestellt.

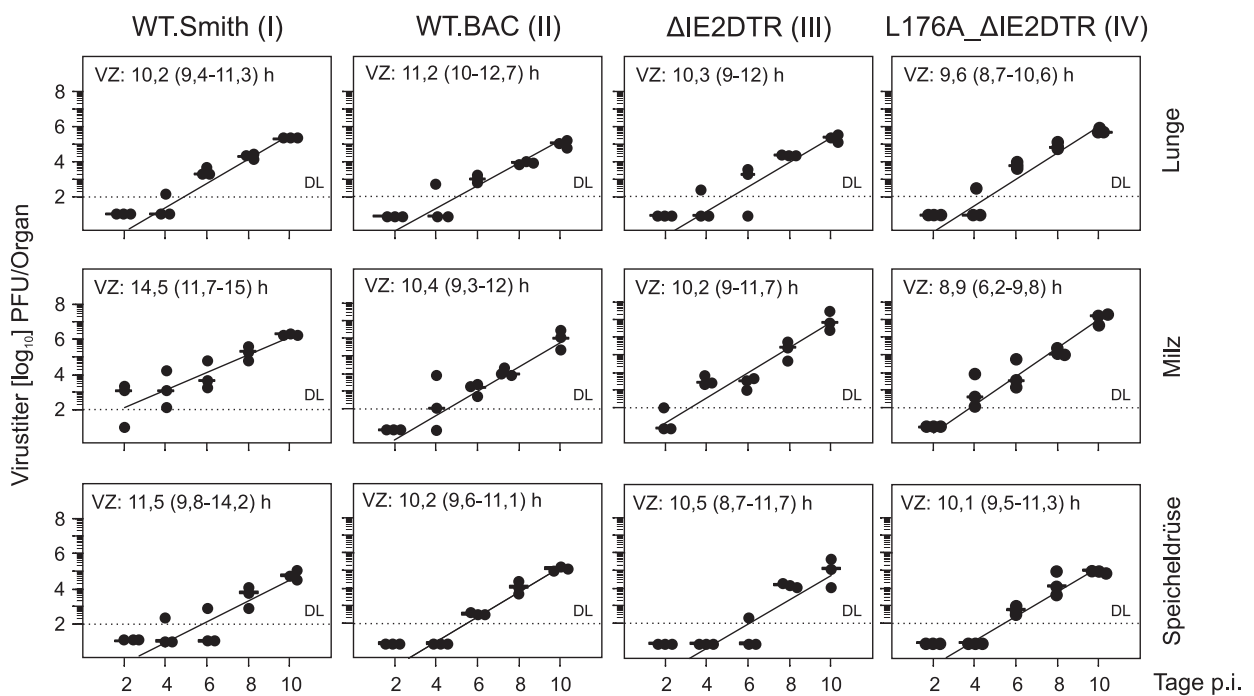


Abb. 3.30: *In vivo*-Replikationskinetik der rekombinanten mCMV-DTR-Viren im Vergleich zu mCMV-WT.BAC und mCMV-WT.Smith. An Tag 2, 4, 6, 8 und 10 nach Infektion wurden Lunge, Milz und Speicheldrüse von je drei mit den rekombinanten Viren (III-IV) bzw. den WT-Stämmen (I-II) infizierten Mäusen entnommen. Die Virustiter in den Organhomogenaten wurden mittels Plaque-Assay bestimmt. Die Mediane der Werte der Einzeltierbestimmung sind durch schwarze horizontale Balken gekennzeichnet. Die Nachweisgrenze (DL) dieses Assays liegt bei 1×10^2 PFU pro Organ (gepunktete Linie). Die Verdopplungszeiten (VZ) der Viren wurden mittels linearer Regressionsanalyse analog zu Simon *et al.* (2006a) (durchgezogene Gerade) ermittelt. Die in Klammer angegebenen Werte geben die 95%-Konfidenzintervalle an. Es wurden folgende Viren dargestellt: (I) WT.Smith, mCMV-WT.Smith; (II) WT.BAC, mCMV-WT.BAC; (III) Δ IE2DTR, mCMV_ Δ IE2DTR; (IV) IE1L176A_ Δ IE2DTR, mCMV-IE1L176A_ Δ IE2DTR.

Bis Tag 2 waren in keinem der ausgewählten Organe infektiöse Partikel nachweisbar, mit Ausnahme der Milz der mCMV-WT.Smith infizierten Mäuse. Erst ab Tag 4 konnte eine Plaquebildung durch die Organhomogenate der Lunge und der Milz einzelner Tiere beobachtet werden. In der Speicheldrüse waren die Viruspartikel erst nach 6 Tagen nachweisbar. Die vier getesteten Viren erreichten jedoch zu den entsprechenden Zeitpunkten vergleichbare Organtiter in den jeweiligen Organen. Um die Verdopplungszeiten der Viren in den einzelnen Organen zu ermitteln, wurde eine lineare Regressionsanalyse unter Verwendung der Mathematika V5.0 Statistik-Software (Wolfram Research Inc.) durchgeführt (Simon *et al.*, 2006a). Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Geraden für das jeweils untersuchte Organ für alle vier Viren parallel verlaufen. Dies bedeutet, dass die *in vivo*-Replikation der getesteten Viren mit gleicher Effizienz erfolgt. Die Berechnung der Verdopplungszeiten zeigt, dass die *in vivo*-Replikation in den drei getesteten Organen in annähernd gleicher Geschwindigkeit verläuft. Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurde das 95%-Konfidenzintervall der Steigung bestimmt (Simon *et al.*, 2006a). Da sich die

Konfidenzintervalle der Steigungen für jedes der getesteten Organe in allen Viren überlappen, wird durch dieses Ergebnis die vergleichbare *in vivo*-Replikation bestätigt. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Insertion des *DTR*-Gens keinen Einfluss auf die *in vivo*-Replikation der rekombinanten Viren hat und keine Attenuierung der einzelnen Viren vorliegt.

3.6.2 Quantifizierung der Virusreplikation durch IE1-spezifische IHC der Leber

Zusätzlich zur quantitativen Bestimmung des Organtiters in Lunge, Milz und Speicheldrüse mittels Plaque-Assay wurde in diesen Individuen die mCMV-Replikation histologisch mittels IE1-spezifischer IHC der Leber verfolgt. Die Färbung des viralen IE1-Proteins ist nicht nur sehr sensitiv, es lassen sich auch infizierte Zellen jeden Stadiums des viralen Replikationszyklus durch diese Methode nachweisen, da das IE1-Protein schon kurz nach der Infektion in großen Mengen synthetisiert wird und es während der gesamten Replikation im Nukleus verbleibt, bis es in der späten Phase der Infektion an der Bildung eines intranukleären Einschlusskörpers beteiligt ist. Die immunhistologische Färbung für je eine Leber der getesteten Viren ist in Abb. 3.31 für die Tage 4, 6, 8 und 10 nach der Infektion exemplarisch aufgezeigt.

Bei allen getesteten Viren waren ab Tag 4 nach der Infektion einzelne IE1-positive Zellen nachweisbar. Im weiteren Verlauf der Infektion war deutlich die Zunahme der Zahl infizierter Hepatocyten und die Bildung neuer Foci erkennbar. Alle Viren zeigten keinen qualitativen Unterschied in der viralen Replikation. Um die Zahl der IE1-positiven Zellen in der Leber quantitativ bestimmen zu können, wurde die Anzahl an IE1-positiven Zellen in einem repräsentativen Bereich von 10mm² pro Leberschnitt für die Tage 2, 4, 6, 8 und 10 nach Infektion für alle getesteten Viren ermittelt. Die Ergebnisse der Quantifizierung der IHC sind in Abb. 3.32 dargestellt. Über die Regressionsgerade ließen sich die Verdopplungszeiten der Viren in der Leber ermitteln und die 95%-Konfidenzintervalle berechnen. Wie erwartet liegen die Verdopplungszeiten aller Viren im Überlappungsbereich, wodurch auch in der Leber ein vergleichbares Wachstum der Rekombinanten im Vergleich zu den WT-Stämmen stattfindet.

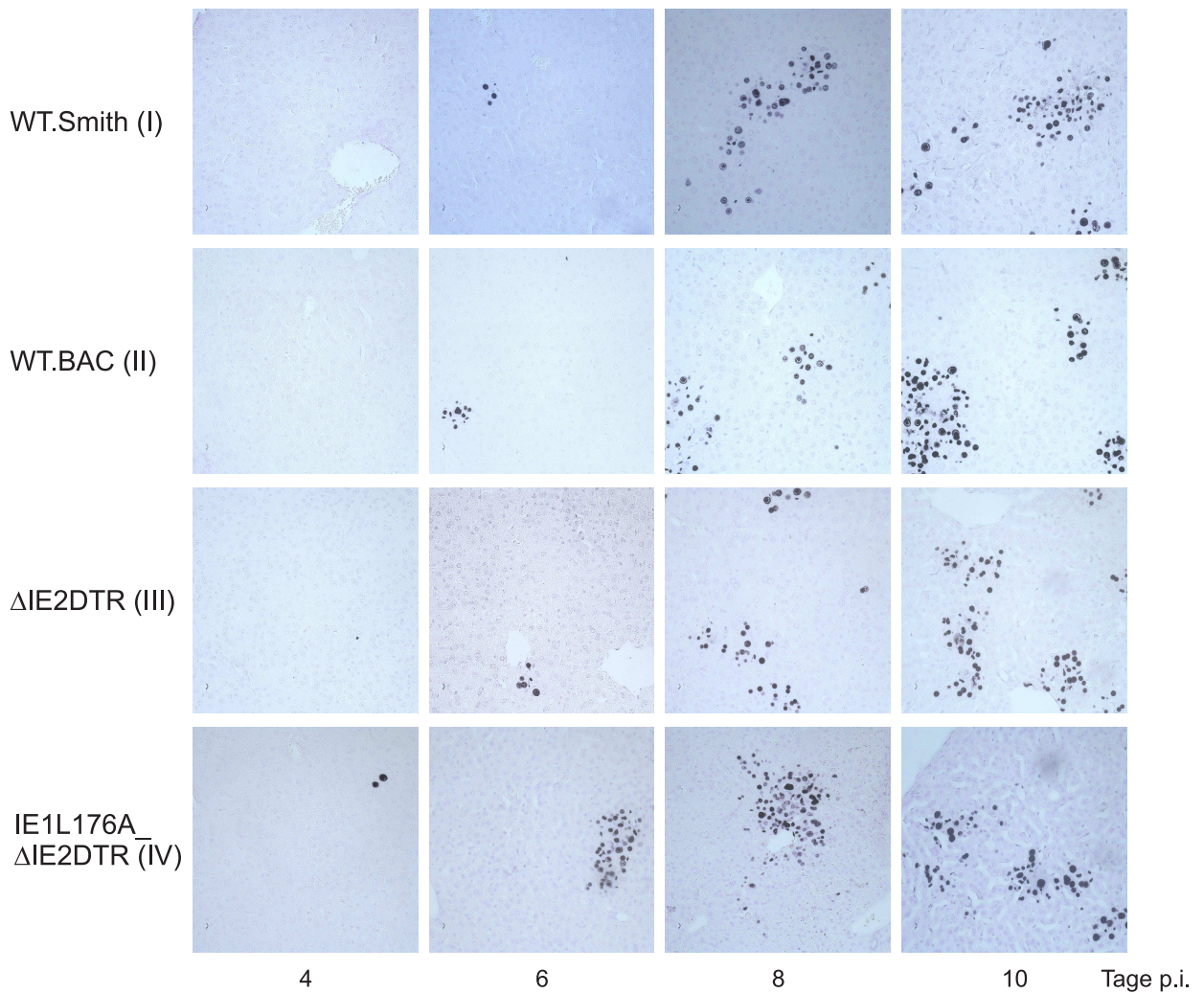


Abb. 3.31: Immunhistologischer Nachweis der *in vivo*-Replikation von mCMV_ΔIE2DTR und mCMV-IE1L176A_ΔIE2DTR im Vergleich zu mCMV-WT.Smith und mCMV-WT.BAC. Der Nachweis von intranukleärem IE1-Protein in infizierten Leberzellen erfolgte immunhistochemisch nach Färbung mit dem monoklonalen Ak Croma 101. Gezeigt werden IE1-positive Zellkerne (schwarz) an Tag 4, 6, 8 und 10 nach Infektion mit den jeweiligen Viren. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun. Es wurden folgende Viren dargestellt: (I) WT.Smith, mCMV-WT.Smith; (II) WT.BAC, mCMV-WT.BAC; (III) ΔIE2DTR, mCMV_ΔIE2DTR; (IV) IE1L176A_ΔIE2DTR, mCMV-IE1L176A_ΔIE2DTR.

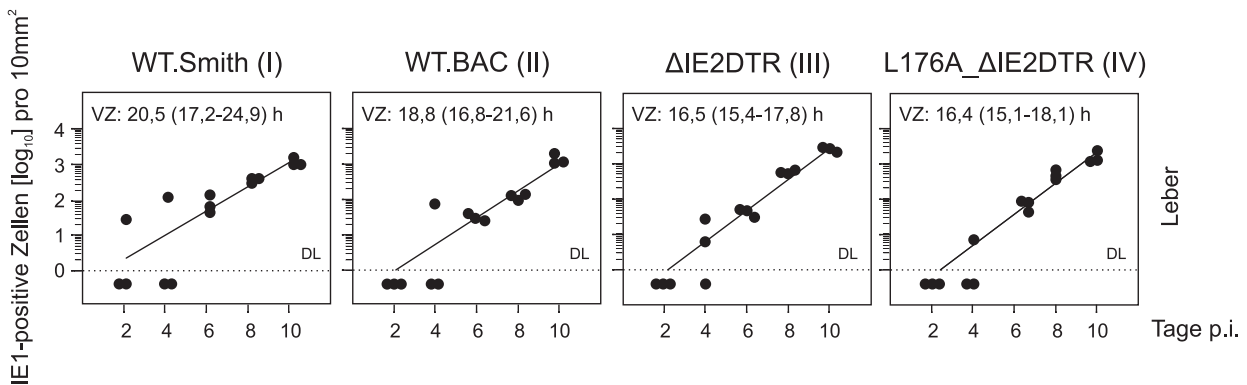


Abb. 3.32: Kinetik der *in vivo*-Replikation der DTR-Mutanten mCMV_ΔIE2DTR und mCMV-IE1L176A_ΔIE2DTR im Vergleich zu mCMV-WT.Smith und mCMV-WT.BAC in der Leber. Von je drei Tieren pro Virusgruppe wurde zu den Zeitpunkten 2, 4, 6, 8 und 10 Tage nach Infektion die Leber der mit den jeweiligen Viren infizierten BALB/c-Mäuse entnommen. Die Zahl der IE1-positiven Zellen in der Leber wurde für einen repräsentativen Bereich von 10mm² immunhistologisch bestimmt. Die Nachweisgrenze (DL) dieser Methode (gepunktete Linie) liegt bei einer IE1-positiven Zelle in einem 10mm² Areal. Durch die Regressionsgerade lassen sich die Verdopplungszeiten (VZ) der getesteten Viren in der Leber ermitteln und die 95%-Konfidenzintervalle (in Klammer angegeben) berechnen. (I) WT.Smith, mCMV-WT.Smith; (II) WT.BAC, mCMV-WT.BAC; (III) ΔIE2DTR, mCMV_ΔIE2DTR; (IV) IE1L176A_ΔIE2DTR, mCMV-IE1L176A_ΔIE2DTR.

Schlussfolgerung:

Für die rekombinanten Viren mCMV_ΔIE2DTR und mCMV-IE1L176A_ΔIE2DTR konnte gezeigt werden, dass sie im Vergleich zu mCMV-WT.Smith und mCMV-WT.BAC in allen getesteten Organen in gleicher Weise replizieren. Durch die Insertion des *DTR*-Gens und die zusätzliche Punktmutation im Codon der Anker-AS des IE1-Peptids ist demnach unter Immunsuppression kein Einfluss auf die *in vivo*-Replikation festzustellen.

3.7 Konditionale Depletion von Virusgenomen durch DT in akut infizierten Mäusen

In vitro-Infektionsstudien unter DT-Behandlung haben gezeigt, dass der DTR funktional ist und somit mCMV_ΔIE2DTR infizierte Zellen konditional mit DT ausgelöscht werden können. Um nun die Virus infizierten Zellen auch *in vivo* konditional und selektiv auslöschen zu können, musste die DT-Konzentration den *in vivo*-Bedingungen angepasst werden und der optimale Zeitpunkt der DT-Applikation ermittelt werden. Die ersten Versuche zur Ermittlung der optimalen Bedingungen wurden in bestrahlten und akut infizierten Mäusen durchgeführt.

3.7.1 Vergleichende Analyse der DT-Applikation i.p. versus i.v.

Mitarbeiter aus der Gruppe von Ari Weisman (Buch *et al.*, 2005) generierten Cre-induzierbare *DTR*-transgene Mäuse, bei denen sie durch eine i.p. DT-Gabe (100ng, alle 8h über 7 Tage) B-Zellen aus der Milz und der Leber komplett auslöschen konnten. Saito *et al.* (2001) beschrieb zudem, dass Hepatocyten mit einer einmaligen *intra muskulären* (i.m.) DT-Gabe von 50ng/g Körpergewicht der Maus ausgelöscht werden können. Da die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Tiere den simian DTR nicht konstitutiv in jeder Zelle exprimieren, sondern der DTR erst durch die Virusinfektion an der Zelloberfläche präsentiert wird und die Virus infizierten Zellen so suszeptibel für DT werden, wurde eine DT-Konzentration von 50ng/g Körpergewicht gewählt und den Mäusen einmalig zu verschiedenen Zeitpunkten appliziert. Das Modell zur Untersuchung der Virusreplikation nach i.p. DT-Gabe ist in Abb. 3.33 gezeigt.

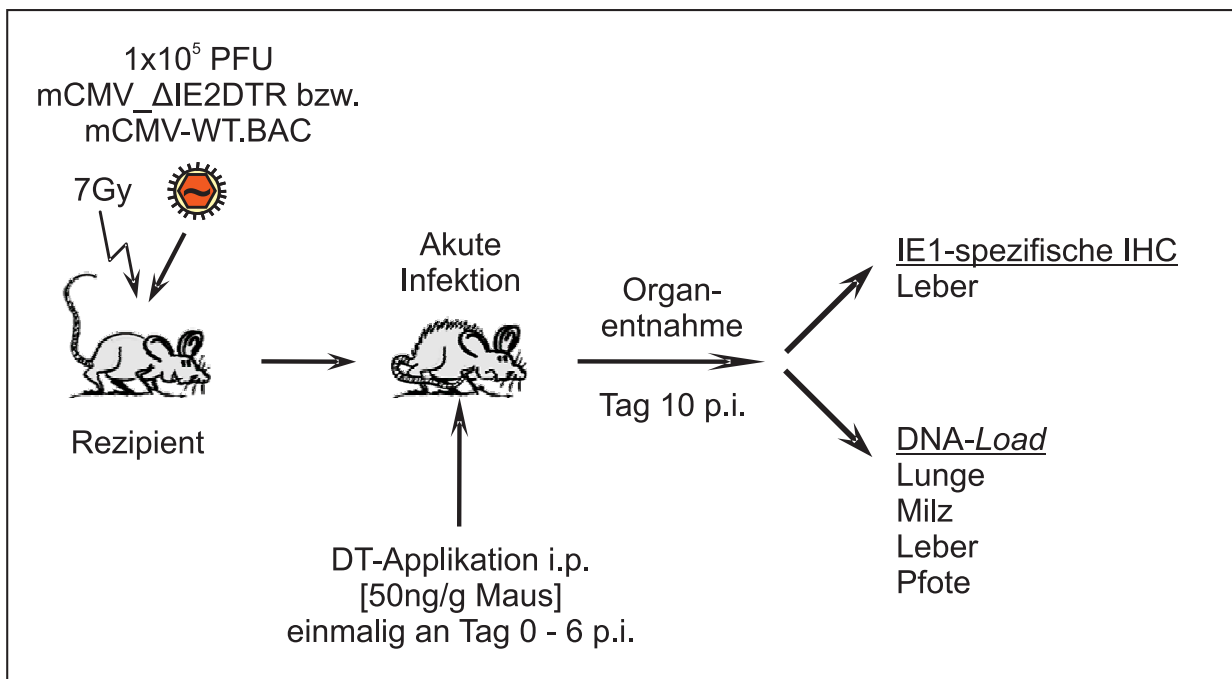


Abb. 3.33: Modell zur Untersuchung der Virusreplikation von mCMV_ΔIE2DTR nach i.p. DT-Applikation. 8 bis 10 Wochen alte BALB/c-Mäuse wurden mit 7Gy bestrahlt und anschließend mit 1×10^5 PFU mCMV_ΔIE2DTR bzw. mCMV-WT.BAC infiziert. An den Tagen 0, 1, 2, 3, 4, 5 und 6 nach der Infektion wurden die Mäuse einmalig mit DT in einer Konzentration von 50ng/g Maus i.p. behandelt. 10 Tage nach Infektion wurden von je drei Mäusen pro Gruppe Lunge, Milz, Leber und Pfote zur Ermittlung der viralen DNA-Load entnommen und die Zahl der infizierten Zellen in der Leber durch IE1-spezifische IHC ermittelt.

8 bis 10 Wochen alte BALB/c-Mäuse wurden hierfür bestrahlt (7Gy) und mit 1×10^5 PFU mCMV_ΔIE2DTR bzw. mCMV-WT.BAC in die Hinterpfote infiziert. Das DT wurde i.p. injiziert, wodurch es im Körper durch das Peritoneum resorbiert wird und schnell in die Blutbahn gelangt, um die Zielorgane zu erreichen. Da der optimale Zeitpunkt der DT-Gabe erst ermittelt

werden musste, wurde das DT zunächst einmalig zu den angegebenen Zeitpunkten von Tag 0 (Tag der Infektion) bis Tag 6 nach Infektion verabreicht. 10 Tage nach der Infektion wurden Lunge, Milz, Speicheldrüse und Leber zur Bestimmung der viralen DNA-Load durch M55- (*gB*) spezifische qPCR (s. 2.4.14) entnommen und zusätzlich die Zahl der IE1-positiven Zellen in der Leber durch IE1-spezifische IHC (s. 2.5.4) bestimmt (s. Abb. 3.33). Die Ergebnisse der einmaligen i.p. DT-Applikation sind in Abb. 3.34 zusammengefasst.

Es ist in Abb. 3.34 sehr deutlich gezeigt, dass eine einmalige i.p. DT-Gabe zu späteren Zeitpunkten (Tag 2 bis 6) keinen Einfluss auf die virale DNA-Load *in vivo* hat. Eine Reduktion der viralen Genome in den entnommenen Organen und der IE1-positiven Zellen in der Leber ist nur zu beobachten, wenn DT bereits 6h nach der Infektion (Tag 0) den Mäusen injiziert wird. Es findet eine Reduktion der Virusgenome um ungefähr 1 log-Stufe statt.

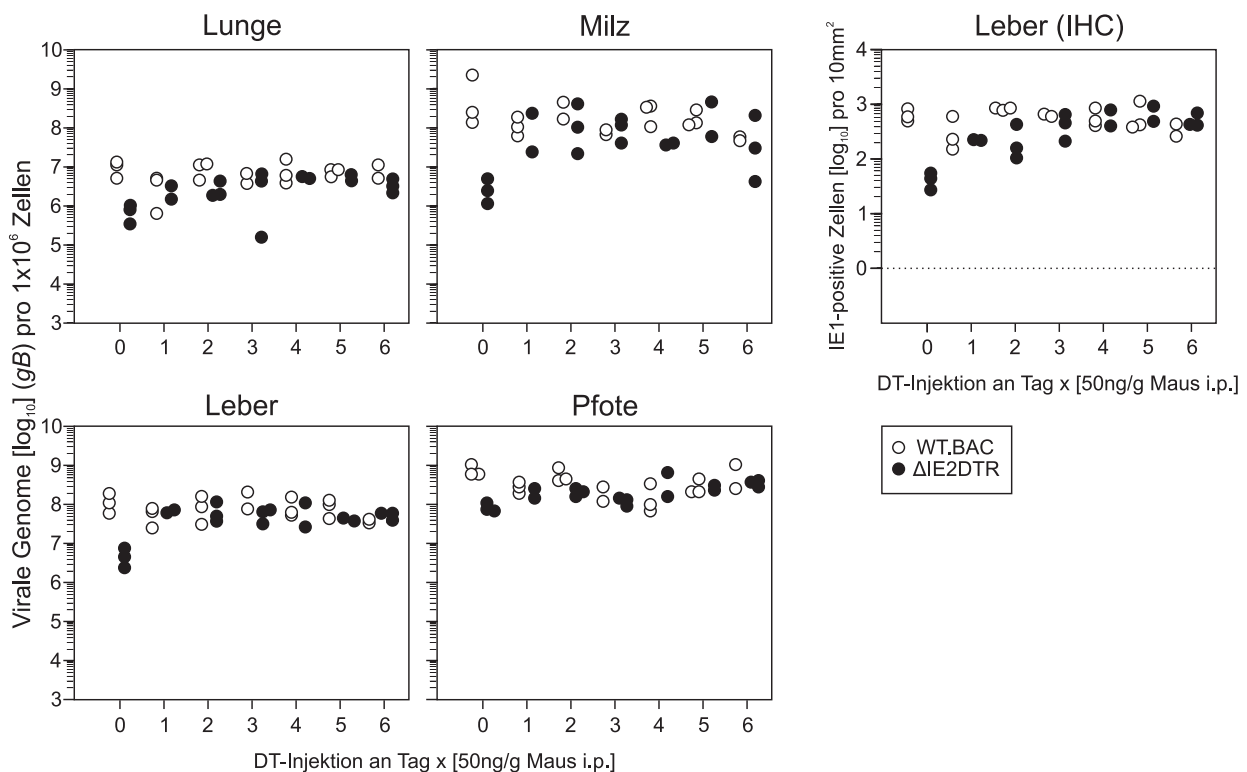


Abb. 3.34: Einfluss einer einmaligen i.p. DT-Gabe zu verschiedenen Zeitpunkten auf die virale DNA-Load mCMV_ΔIE2DTR bzw. mCMV-WT.BAC akut infizierter Mäuse. BALB/c-Mäuse wurden bestrahlt und anschließend mit mCMV_ΔIE2DTR bzw. mCMV-WT.BAC akut infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Infektion wurden die Mäuse einmalig i.p. mit 50ng/g Maus DT behandelt. Die Organentnahme erfolgte 10 Tage nach der Infektion. Bei einigen Gruppen sind jeweils nur Ergebnisse für zwei von drei Tieren aufgeführt, da einige Tiere frühzeitig verstarben. Gezeigt ist die virale DNA-Load in verschiedenen Organen und die Zahl der IE1-positiven Zellen in der IHC der Leber. Zur Bestimmung der viralen DNA-Load wurde eine M55- (*gB*) spezifische qPCR durchgeführt und durch eine *pthrp*-spezifische qPCR auf 1×10^6 Zellen normiert. Weiße Kreise: mCMV-WT.BAC infizierte Mäuse, schwarze Kreise: mCMV_ΔIE2DTR infizierte Mäuse.

Obwohl das DT durch die i.p. Injektion schnell in den Blutkreislauf gelangt, konnte das Virus bei der DT-Gabe an Tag 1 und später nach der Infektion ohne Einschränkung replizieren (s. Abb. 3.34). Die Vermutung liegt somit nahe, dass das DT im Körper der Maus nur für kurze Zeit in ausreichender Konzentration verfügbar ist, und die Zeitspanne zwischen Injektion und Erreichen der infizierten Zellen zu groß ist. Der vorangegangene Versuch (s. Abb. 3.34) wurde daraufhin wiederholt, jedoch mit dem Unterschied, dass das DT nun i.v. in die laterale Schwanzvene zu den angegebenen Zeitpunkten injiziert wurde (s. Abb. 3.35) und damit sichergestellt wird, dass das DT innerhalb von wenigen Sekunden die Zielorgane umspült und die infizierten Zellen erreichen und auslöschen kann.

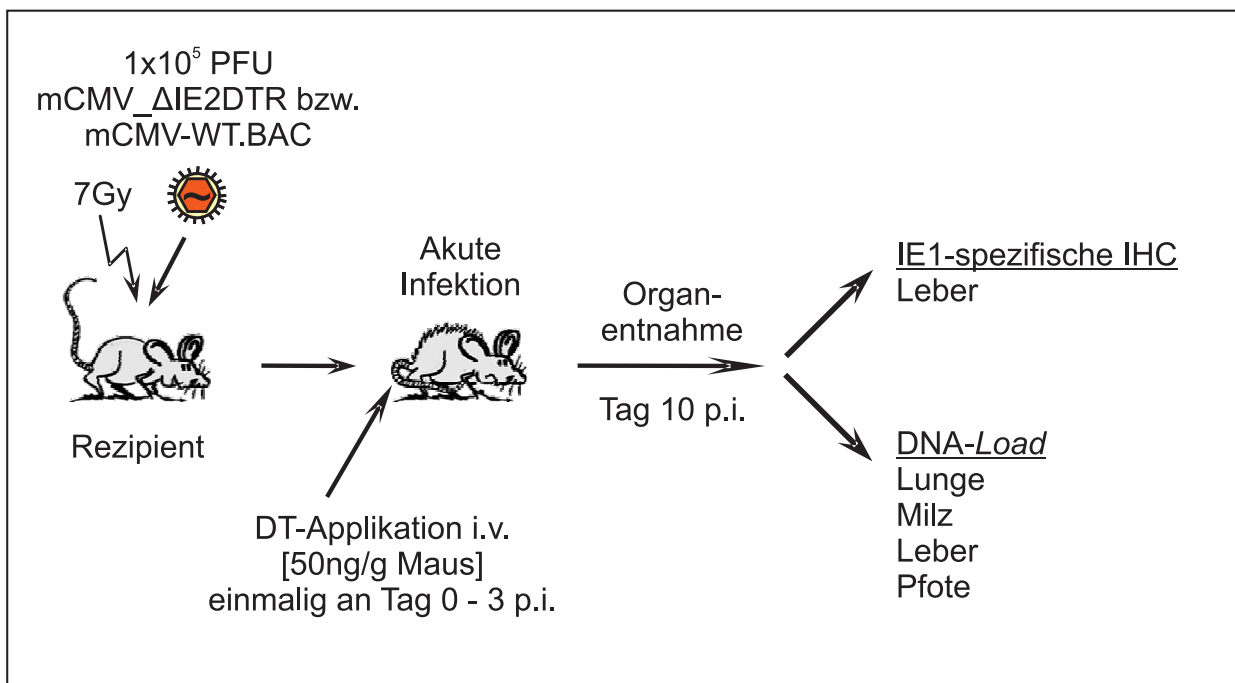


Abb. 3.35: Modell zur Untersuchung der Virusreplikation von $\text{mCMV}_{\Delta\text{IE2DTR}}$ nach i.v. DT-Applikation. 8 bis 10 Wochen alte BALB/c-Mäuse wurden mit 7Gy bestrahlt und anschließend mit 1×10^5 PFU $\text{mCMV}_{\Delta\text{IE2DTR}}$ bzw. mCMV-WT.BAC infiziert. An den Tagen 0, 1, 2 und 3 nach der Infektion wurden die Mäuse einmalig mit DT in einer Konzentration von 50ng/g Maus i.v. behandelt. 10 Tage nach Infektion wurden von je drei Mäusen pro Gruppe Lunge, Milz, Leber und Pfote zur Ermittlung der viralen DNA-Load entnommen und die Zahl der infizierten Zellen in der Leber durch IE1-spezifische IHC ermittelt.

Es wird deutlich, dass eine i.v. DT-Gabe (s. Abb. 3.36) wesentlich effektiver in der Auslöschung viraler Genome ist, v.a. zu den späteren Zeitpunkten (Tag 1 bis 3), im Vergleich zu einer i.p. DT-Gabe. Eine Reduktion der viralen Genome um 1 bis 2 log-Stufen ist zu allen getesteten Zeitpunkten von Tag 0 bis Tag 3 zu beobachten. Die DT-Gabe an Tag 0 ist jedoch im Vergleich zu den späteren Zeitpunkten am effektivsten.

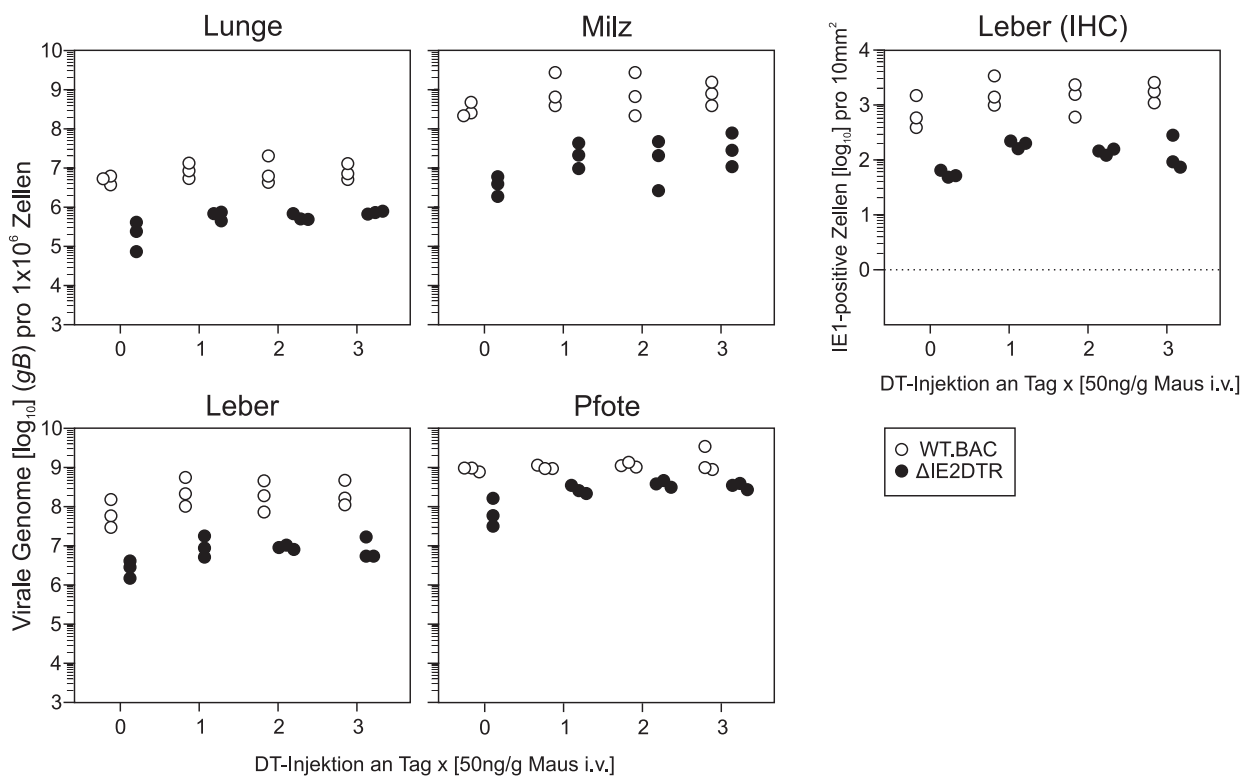


Abb. 3.36: Einfluss einer einmaligen i.v. DT-Gabe zu verschiedenen Zeitpunkten auf die virale DNA-Load mCMV_ΔIE2DTR bzw. mCMV-WT.BAC akut infizierter Mäuse. BALB/c-Mäuse wurden bestrahlt und mit mCMV_ΔIE2DTR bzw. mCMV-WT.BAC akut infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Infektion wurden die Mäuse einmalig i.v. mit 50ng/g Maus DT behandelt. Die Organentnahme erfolgte 10 Tage nach der Infektion. Gezeigt ist die virale DNA-Load in verschiedenen Organen und die Zahl der IE1-positiven Zellen in der IHC der Leber. Zur Bestimmung der viralen DNA-Load wurde eine M55- (gB) spezifische qPCR durchgeführt und durch *p_{thrp}*-spezifische qPCR auf 1×10⁶ Zellen normiert. Weiße Kreise: mCMV-WT.BAC infizierte Mäuse, schwarze Kreise: mCMV_ΔIE2DTR infizierte Mäuse.

3.7.2 Bestimmung der optimalen DT-Konzentration *in vivo*

Durch die bisherige DT-Konzentration von 50ng DT/g Körpergewicht (i.v.) konnte die Anzahl der viralen Genome um 1 bis 2 log-Stufen reduziert werden. Eine niedrigere DT-Konzentration könnte jedoch den gleichen Effekt hervorrufen, bzw. eine höhere DT-Konzentration könnte eine stärkere Reduktion infizierter Zellen zur Folge haben. Um dies zu testen wurde das DT, ausgehend von 500ng DT/g Körpergewicht in log₁₀-Stufen bis 0,5ng/g Maus titriert, einmalig in den verschiedenen Konzentrationen den bestrahlten (7Gy) und mit mCMV_ΔIE2DTR bzw. mCMV-WT.BAC akut infizierten Mäusen i.v. an Tag 0 (6h nach Infektion) injiziert. Die Organe wurden am zehnten Tag nach der Infektion entnommen und die Zahl der viralen Genome durch qPCR bestimmt, sowie die Zahl der IE1-positiven Zellen in der Leber durch IE1-spezifische IHC ermittelt (s. Abb. 3.37). Die Ergebnisse der *in vivo* Dosis-Wirkungs-Kurve für DT sind in Abb. 3.38 dargestellt.

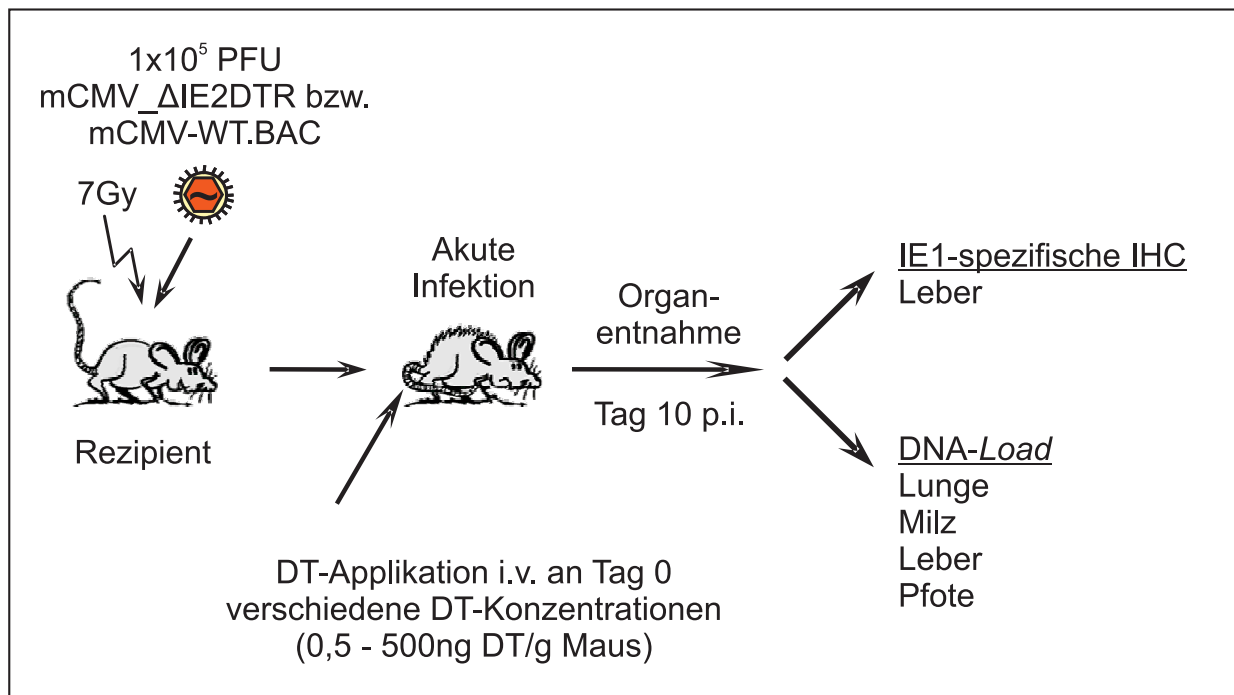


Abb. 3.37: Modell zur Bestimmung der optimalen DT-Konzentration *in vivo*. 8 bis 10 Wochen alte BALB/c-Mäuse wurden mit 7Gy bestrahlt und anschließend mit 1×10^5 PFU $\text{mCMV}_{\Delta\text{IE2DTR}}$ bzw. mCMV-WT.BAC akut infiziert. Am Tag der Infektion (6h nach Infektion) wurden die Mäuse einmalig i.v. mit verschiedenen DT-Konzentrationen (0,5 bis 500ng/g Maus) behandelt. 10 Tage nach Infektion wurde von je drei Mäusen pro Gruppe Lunge, Milz, Leber und Pfote zur Ermittlung der viralen DNA-Load entnommen und die Zahl der infizierten Zellen in der Leber durch IE1-spezifische IHC ermittelt.

Bei diesem Versuch verstarben bei einer einmaligen DT-Konzentration von 500ng/g Körpergewicht alle Tiere, sowohl mCMV-WT.BAC , als auch $\text{mCMV}_{\Delta\text{IE2DTR}}$ infizierte Tiere (s. Abb. 3.38). Eine DT-Konzentration von 50ng/g Körpergewicht bestätigte die Ergebnisse des vorherigen Versuchs (s. Abb. 3.36). Die Anzahl an viralen Genomen in den getesteten Organen bzw. die Anzahl an IE1-positiven Zellen in der Leber wurde durch das DT in $\text{mCMV}_{\Delta\text{IE2DTR}}$ infizierten Mäusen um 1 bis 2 log-Stufen reduziert. Geringere DT-Konzentrationen von 5ng/g Körpergewicht und 0,5ng/g Körpergewicht zeigten eine deutliche dosisabhängige Reduktion der viralen Genome in allen Organen $\text{mCMV}_{\Delta\text{IE2DTR}}$ infizierter Mäuse. Eine Erhöhung der DT-Konzentration ist demnach nicht möglich. Somit wurden die Versuche weiterhin mit einer DT-Konzentration von 50ng/g Körpergewicht durchgeführt.

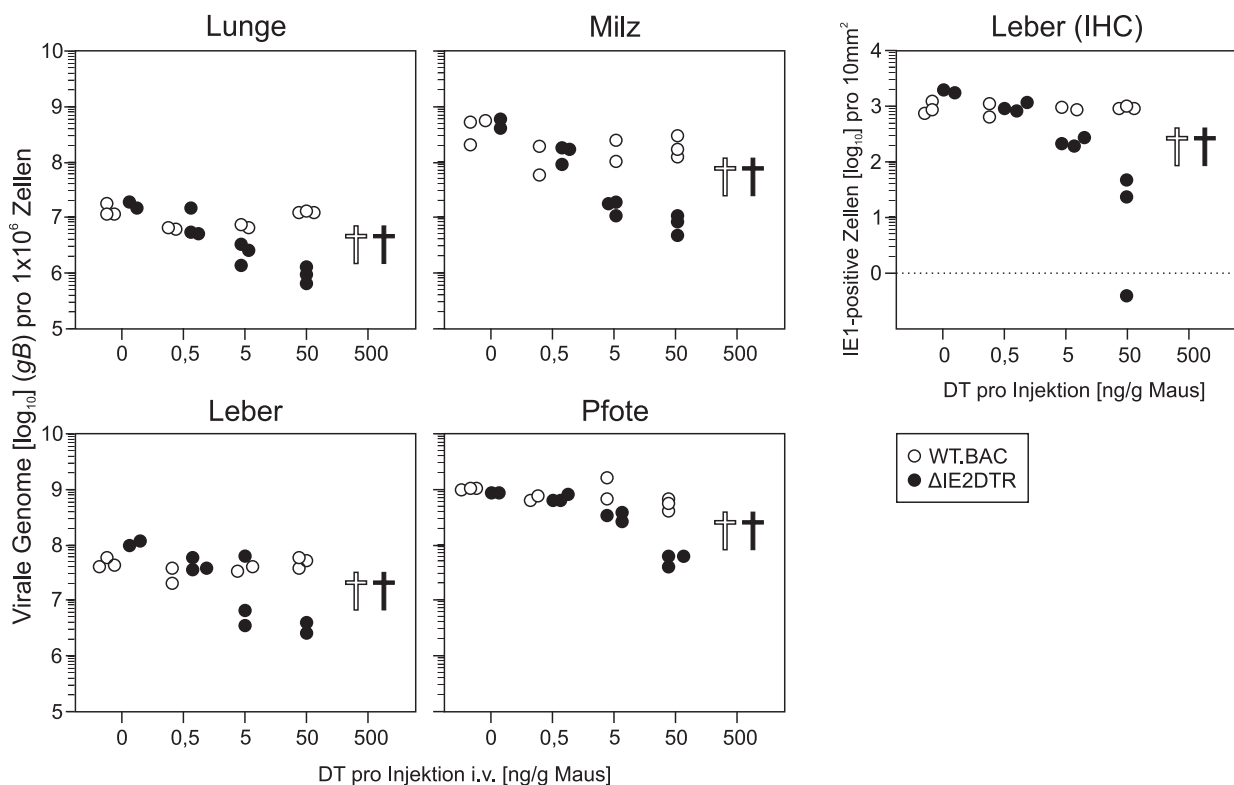


Abb. 3.38: *In vivo* DT Dosis-Wirkungs-Kurve für BALB/c-Mäuse, akut infiziert mit mCMV_ΔIE2DTR bzw. mCMV-WT.BAC. BALB/c-Mäuse wurden bestrahlt und mit mCMV-WT.BAC bzw. mCMV_ΔIE2DTR infiziert. 6h nach der Infektion wurde DT einmalig in verschiedenen Dosen (0,5 bis 500ng/g Maus i.v.) in die laterale Schwanzvene injiziert. 10 Tage nach Infektion wurden Lunge, Milz, Leber und Pfote entnommen, um die Zahl der viralen Genome bzw. die Zahl der infizierten Zellen in der Leber zu bestimmen. Hierzu wurde eine M55- (gB) spezifische qPCR durchgeführt und durch *pthrp*-spezifische qPCR auf 1×10^6 Zellen normiert. Weiße Kreise: WT.BAC infizierte Mäuse; schwarze Kreise: mCMV_ΔIE2DTR infizierte Mäuse. Bei einigen Gruppen sind jeweils nur Ergebnisse für zwei von drei Tieren aufgeführt, da einige Tiere frühzeitig verstarben. Die weißen (mCMV-WT.BAC) und schwarzen (mCMV_ΔIE2DTR) Kreuze symbolisieren die bei einer DT-Konzentration von 500ng/g Maus vor Versuchsende verstorbenen Tiere.

3.7.3 Bestimmung des optimalen Zeitpunkts der DT-Applikation

Bisher wurde das DT 6h nach der Infektion verabreicht. Da die Zahl der viralen Genome jedoch nur um maximal 2 log-Stufen reduziert werden konnte, wurde versucht, den optimalen Zeitpunkt der DT-Gabe genauer zu bestimmen. Vielleicht musste das DT noch früher verabreicht werden, um sofort die ersten DTR-exprimierenden Zellen auszulöschen und somit eine Expansion des Virus zu verhindern. Eine andere Möglichkeit wäre jedoch länger zu warten, bis genügend Zellen infiziert und suszeptibel für das DT sind, um auf einen Schlag eine große Anzahl an Virusgenomen zu reduzieren.

Mäuse wurden bestrahlt und mit mCMV_ΔIE2DTR infiziert. Die Zeitpunkte der DT-Gabe wurden in diesem Versuch so gewählt, dass DT zu einem noch früheren Zeitpunkt (2h nach Infektion) und nach der DNA-Replikation des Virus (16h nach Infektion) bzw. nach der Virusreplikation (24h nach Infektion) verabreicht wurde. Die Organe wurden ebenfalls am zehnten Tag nach der Infektion entnommen und die Zahl der viralen Genome durch qPCR und die Zahl an IE1-positiven Zellen in der Leber durch IHC bestimmt (s. Abb. 3.39).

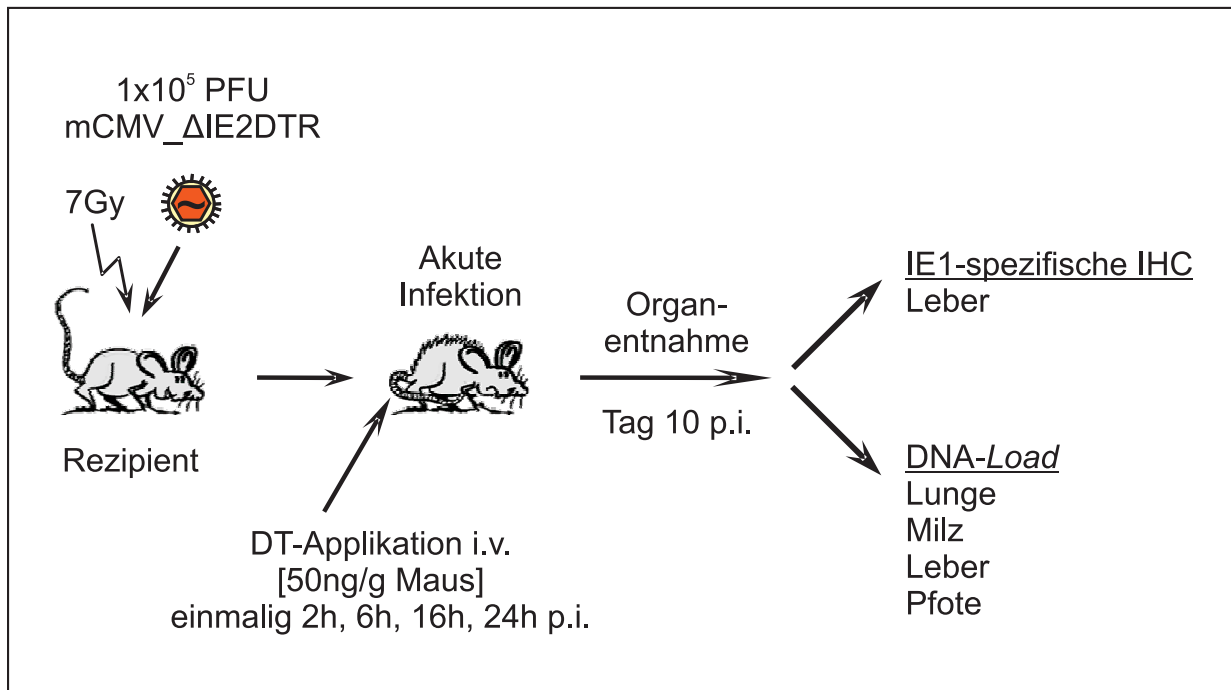


Abb. 3.39: Modell zur Bestimmung des optimalen Zeitpunkts der DT-Applikation.

8 bis 10 Wochen alte BALB/c-Mäuse wurden mit 7Gy bestrahlt und anschließend mit 1×10^5 PFU mCMV_ΔIE2DTR infiziert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion (2h, 6h, 16h und 24h nach Infektion) wurden die Mäuse einmalig i.v. mit 50ng/g Maus DT behandelt. 10 Tage nach Infektion wurde von je drei Mäusen pro Gruppe Lunge, Milz, Leber und Pfote zur Ermittlung der viralen DNA-Load entnommen und die Zahl der infizierten Zellen in der Leber durch IE1-spezifische IHC ermittelt.

Zu allen Zeitpunkten der DT-Gabe war eine deutliche Reduktion der viralen Genome um 1 bis 2 log-Stufen zu beobachten (s. Abb. 3.40). Es zeigte sich jedoch in den getesteten Organen die stärkste Reduktion der viralen DNA-Load bei einer DT-Gabe 6h nach der Infektion. Der Zeitpunkt der DT-Applikation 6h nach der Infektion wurde somit beibehalten.

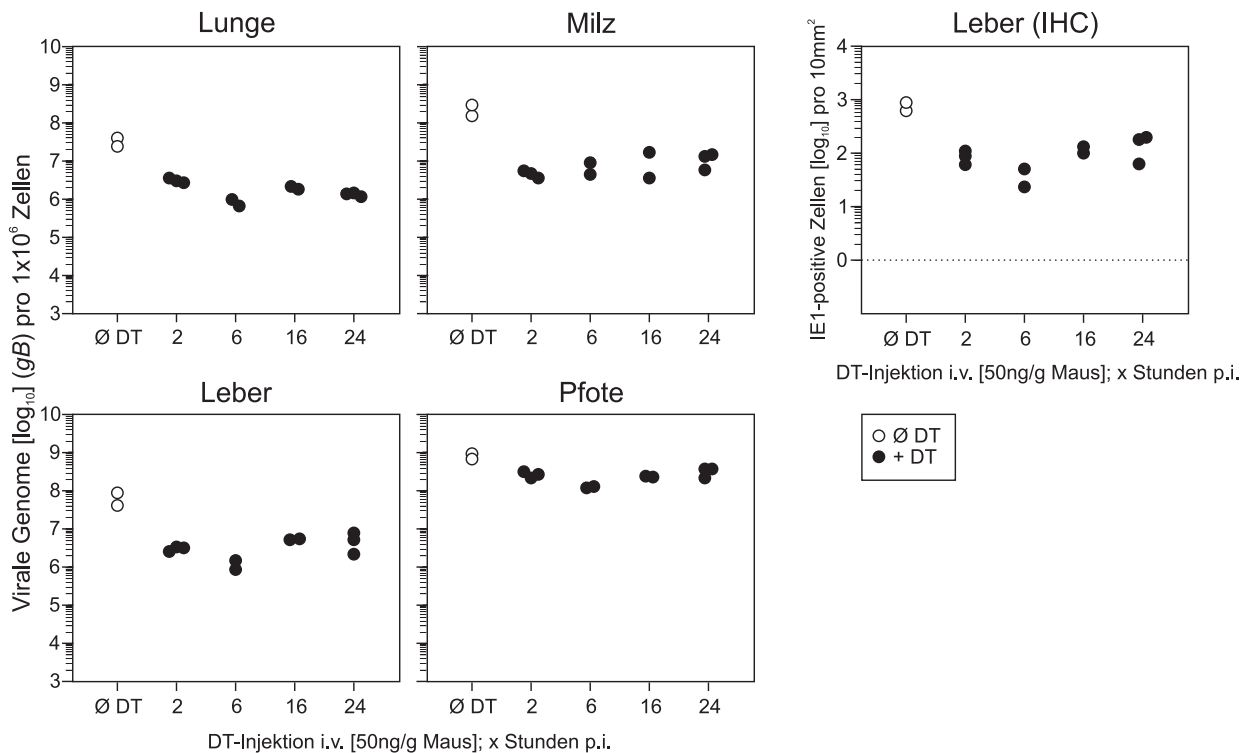


Abb. 3.40: Ermittlung des optimalen Zeitpunkts der i.v. DT-Injektion mCMV_ΔIE2DTR akut infizierter Mäuse zur Reduktion der viralen DNA-Load. BALB/c-Mäuse wurden bestrahlt und mit 1×10^5 PFU mCMV_ΔIE2DTR akut infiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion (2h, 6h, 16h und 24h nach Infektion) wurden die Mäuse einmalig i.v. mit DT behandelt. Die Organentnahme von jeweils drei Mäusen pro Gruppe erfolgte 10 Tage nach der Infektion. Bei einigen Gruppen sind jeweils nur Ergebnisse für zwei Tiere aufgeführt, da die anderen Tiere frühzeitig verstarben. Gezeigt ist die virale DNA-Load in verschiedenen Organen, ermittelt durch eine M55- (*gB*) spezifische qPCR und Normierung auf 1×10^6 Zellen durch eine *pthrp*-spezifische qPCR, und die Zahl der IE1-positiven Zellen in der IHC der Leber. Weiße Kreise: PBS-behandelte Tiere; schwarze Kreise: DT-behandelte Tiere.

3.7.4 Reduktion der viralen DNA-Load durch repetitive DT-Applikation

Zur konditionalen Depletion von Virusgenomen durch DT in mCMV_ΔIE2DTR infizierten Tieren wurden die Mäuse wie bisher bestrahlt (7Gy) und mit 1×10^5 PFU mCMV_ΔIE2DTR akut infiziert. Um die Versuchsparameter zu optimieren, wurde den Mäusen das DT in einer Konzentration von 50ng/g Körpergewicht repetitiv (bis zu 3×50 ng/g Maus) i.v. injiziert. Die erste Injektion erfolgte 6h nach der Infektion, weitere DT-Applikationen erfolgten jeweils in einem Abstand von 16h (s. Abb. 3.41).

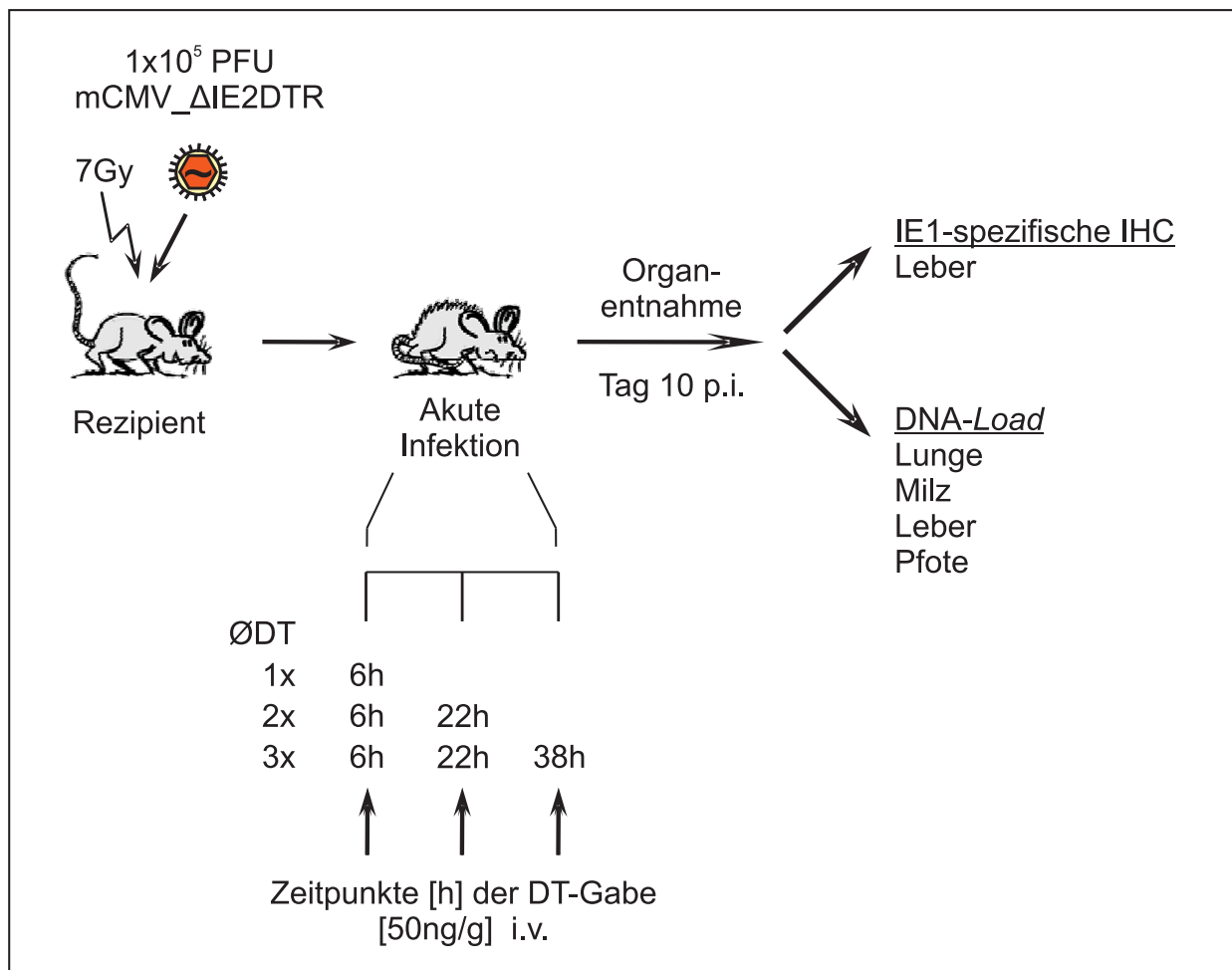


Abb. 3.41: Modell zur Reduktion der viralen DNA-Load durch eine repetitive (dreimalige) DT-Applikation. 8 bis 10 Wochen alte BALB/c-Mäuse wurden mit 7Gy bestrahlt und anschließend mit 1×10^5 PFU $mCMV_{\Delta IE2DTR}$ infiziert. Die Tiere wurden 6h nach der Infektion i.v. mit 50ng/g Maus DT behandelt, alle weiteren DT-Applikationen erfolgten in einem Abstand von jeweils 16h. Insgesamt wurden die Mäuse bis zu dreimal mit DT behandelt. Als Kontrolle dienen infizierte, DT-unbehandelte Tiere. 10 Tage nach Infektion wurde von je drei Mäusen pro Gruppe Lunge, Milz, Leber und Pfote zur Ermittlung der viralen DNA-Load entnommen und die Zahl der infizierten Zellen in der Leber durch IE1-spezifische IHC ermittelt.

Zwei von drei Tieren starben durch eine dreimalige DT-Applikation von 50ng/g Körpergewicht (s. Abb. 3.42). Gab man DT nur zweimal, konnte die virale DNA-Load um fast 2,5 log-Stufen reduziert werden. Es war jedoch durch das eine überlebende Tier bei dreimaliger DT-Gabe eine Tendenz zu erkennen, die vermuten lässt, dass weitere DT-Injektionen die Zahl der viralen Genome noch weiter reduzieren können.

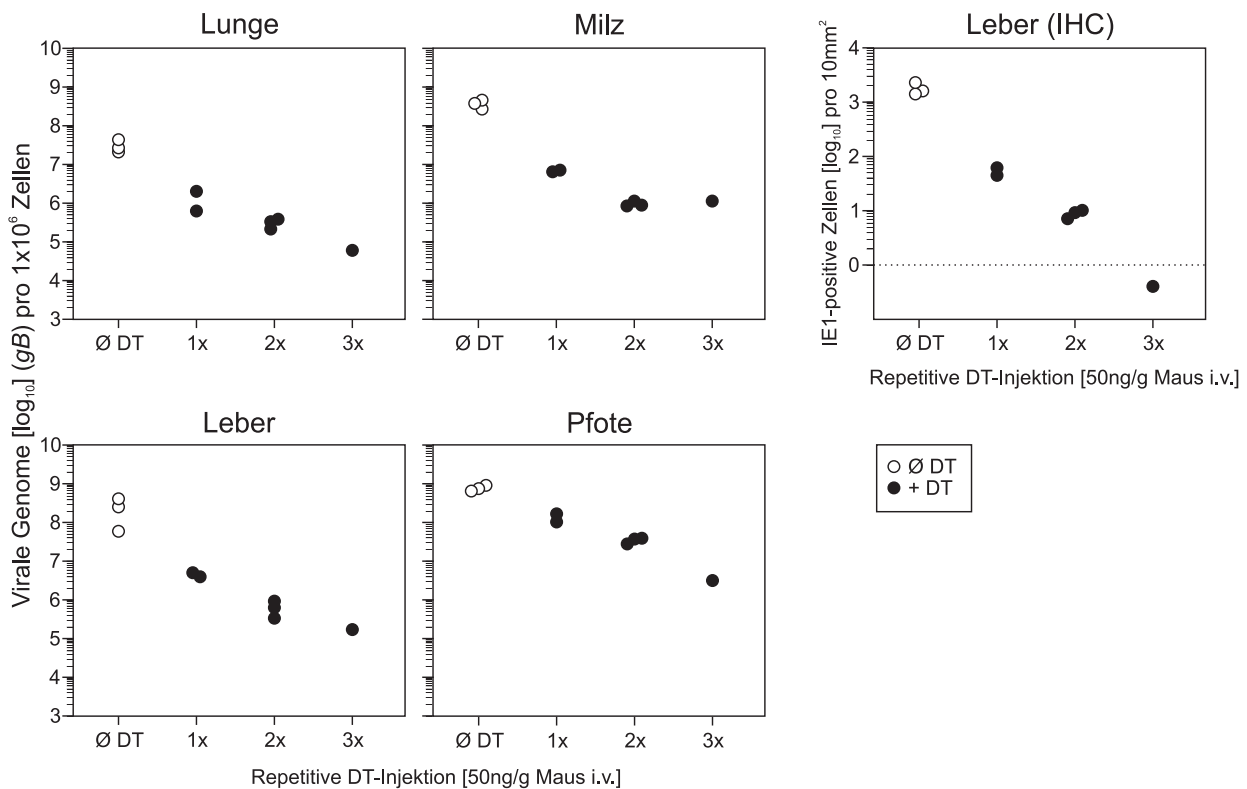


Abb. 3.42: Einfluss einer repetitiven i.v. DT-Gabe auf die virale DNA-Load in mCMV_ΔIE2DTR akut infizierten Mäusen. BALB/c-Mäuse wurden mit 7Gy bestrahlt und mit 1×10^5 PFU mit mCMV_ΔIE2DTR akut infiziert. Nach der Infektion wurden die Tiere einmal (6h nach Infektion), zweimal (6h und 22h nach Infektion) bzw. dreimal (6h, 22h und 38h nach Infektion) i.v. mit 50ng DT/g Maus behandelt. Die Organentnahme von jeweils drei Mäusen pro Gruppe erfolgte 10 Tage nach der Infektion. Gezeigt ist die virale DNA-Load in verschiedenen Organen, ermittelt durch eine M55- (gB) spezifische qPCR und Normierung auf 1×10^6 Zellen durch eine *pthrp*-spezifische qPCR, und die Zahl der IE1-positiven Zellen in der IHC der Leber. Weiße Kreise: PBS-behandelte Tiere; schwarze Kreise: DT-behandelte Tiere.

Da die Akkumulation des DT bei einer dreimaligen DT-Gabe von 50ng/g Körpergewicht zum Tod fast aller Mäuse führte, reduzierten wir die DT-Konzentration auf 10ng/g Körpergewicht und behandelten die mit mCMV_ΔIE2DTR akut infizierten Mäuse statt dessen fünfmal alle 16h (erste DT-Injektion 6h nach Infektion) mit einer niedrigeren DT-Dosis (s. Abb. 3.43). Die Reduktion der IE1-positiven Zellen, exemplarisch für je eine Leber, entnommen am zehnten Tag nach der Infektion, ist in Abb. 3.44 dargestellt.

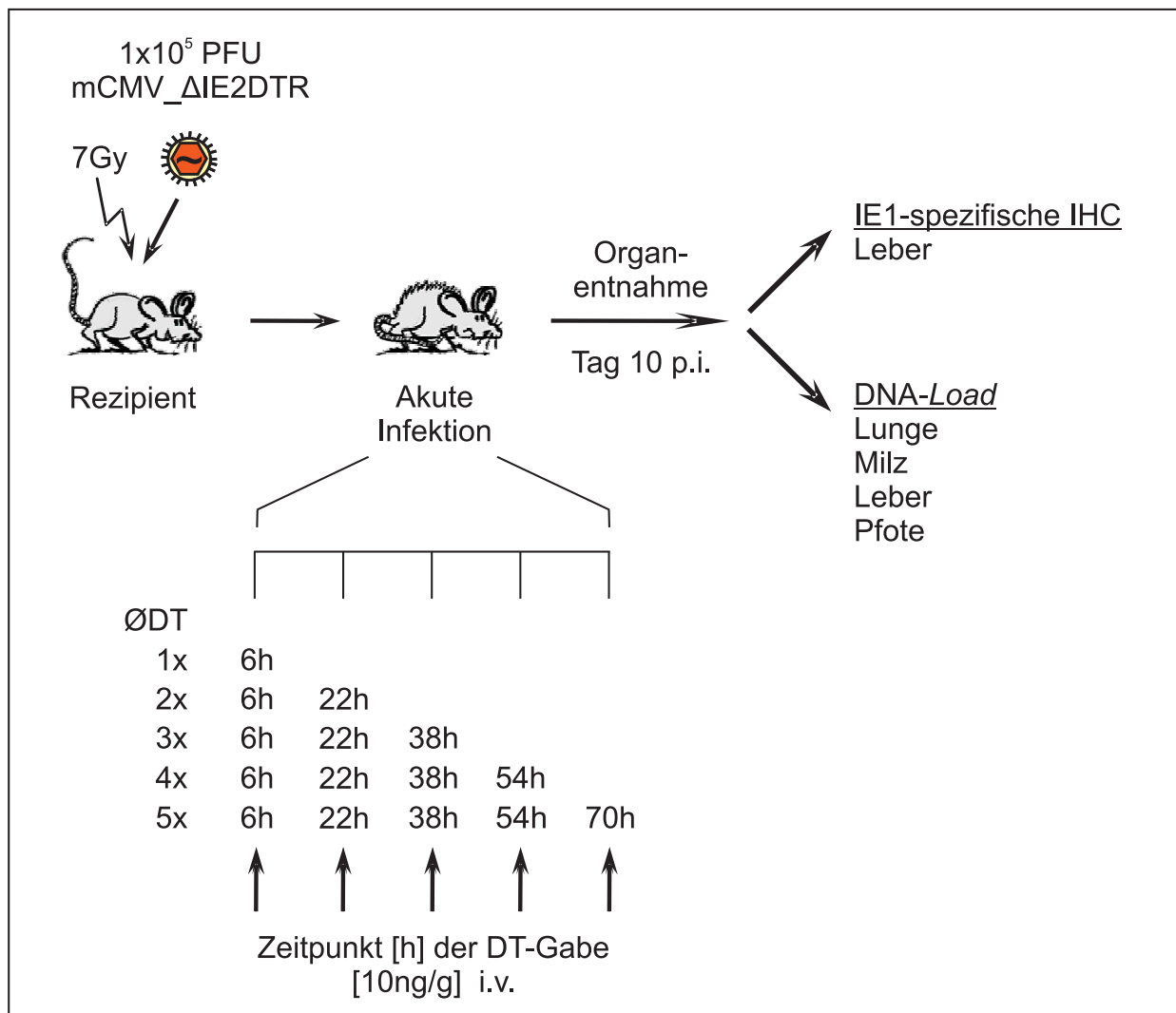


Abb. 3.43: Modell zur Reduktion der viralen DNA-Load durch repetitive (fünfmalige) DT-Gabe mit verringerter DT-Konzentration. 8 bis 10 Wochen alte BALB/c-Mäuse wurden mit 7Gy bestrahlt und anschließend mit 1×10^5 PFU $mCMV_{\Delta IE2DTR}$ infiziert. Die Tiere wurden 6h nach der Infektion i.v. mit 10ng/g Maus DT behandelt. Alle weiteren DT-Applikationen erfolgten in einem Abstand von jeweils 16h . Insgesamt wurden die Mäuse bis zu fünfmal mit DT behandelt. Als Kontrolle dienten infizierte, DT-unbehandelte Tiere. 10 Tage nach Infektion wurden von je drei Mäusen pro Gruppe Lunge, Milz, Leber und Pfote zur Ermittlung der viralen DNA-Load entnommen und die Zahl der infizierten Zellen in der Leber durch IE1-spezifische IHC ermittelt.

Es wird sehr deutlich, dass bereits eine einmalige DT-Gabe mit erniedrigter DT-Konzentration von 10ng/g Maus zu einer Reduktion von IE1-positiven Zellen in den Leberschnitten führt; Jedoch erst bei einer fünfmaligen DT-Gabe sind in den Leberschnitten der ausgewählten Mäuse keinerlei infizierte Zellen nachzuweisen (s. Abb. 3.44). In zwei von drei Tieren sank die Zahl der IE1-positiven Zellen in der Leber sogar unter das Detektionslimit (s. Abb. 3.45).

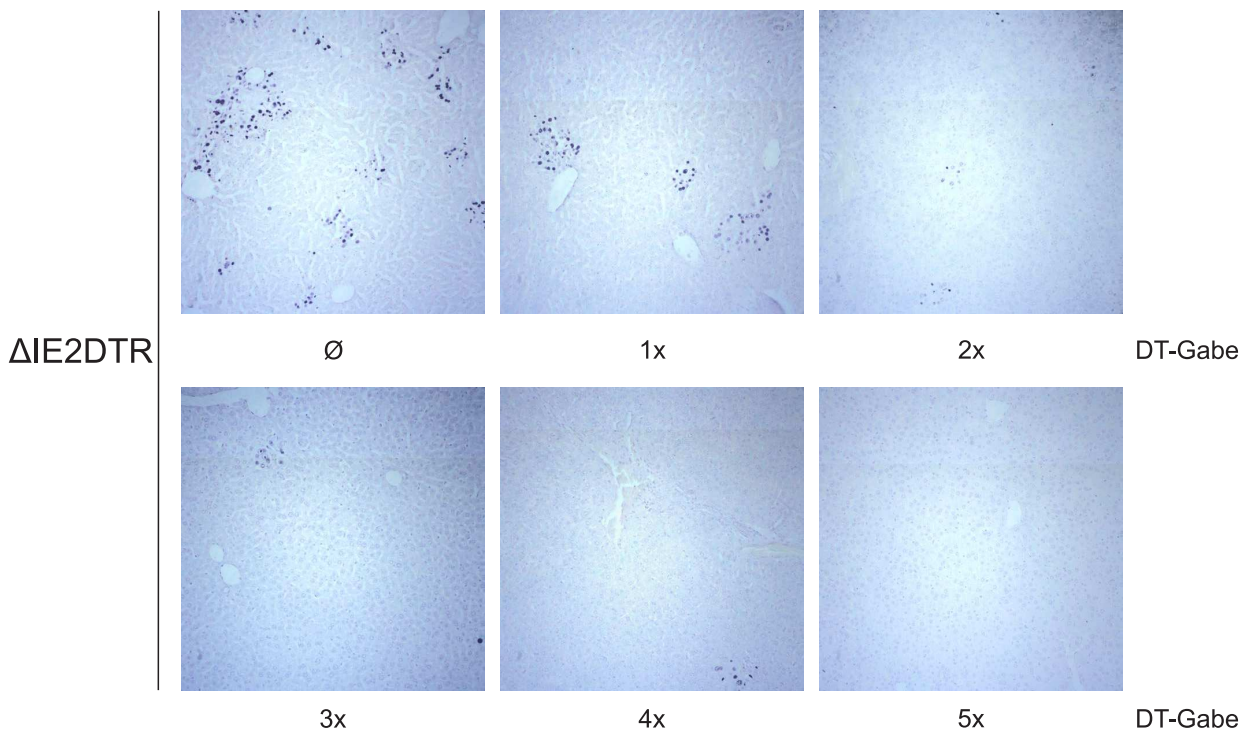


Abb. 3.44: Immunhistologischer Nachweis der IE1-positiven Zellen in der Leber nach fünfmaliger DT-Applikation. Der Nachweis von intranukleärem IE1-Protein in infizierten Leberzellen erfolgte immunhistochemisch nach Färbung mit dem monoklonalen Ak Croma 101. Gezeigt ist die Abnahme an IE1-positiven Zellkernen (schwarz) nach mehrmaliger DT-Gabe. Die Leber wurde an Tag 10 nach Infektion entnommen. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalan.

Die Zahl der viralen Genome in Lunge, Milz, Leber und Pfote wurde an Tag 10 nach der Infektion durch M55- (*gB*) spezifische qPCR und Normierung auf 1×10^6 Zellen bestimmt und die IE1-positiven Zellen in der Leber durch IHC ermittelt (s. Abb. 3.44 und 3.45). Es ist deutlich zu erkennen, dass jede weitere DT-Gabe die virale DNA-Load weiter absenkt. Die Zahl der viralen Genome konnte durch die fünfmalige DT-Gabe sogar um fast 3 log-Stufen im Vergleich zu DT-unbehandelten Tieren gesenkt werden. Die Quantifizierung der viralen Genome in den verschiedenen Organen bestätigte somit die Vermutung, dass eine fünfmalige repetitive DT-Gabe von 10ng/g Maus effektiver in der Auslöschung infizierter Zellen ist als eine zweimalige DT-Behandlung mit 50ng/g Maus. Die Ermittlung der Virustiter (s. Abb. 3.46) in Lunge, Milz und Speicheldrüse bestätigten die Ergebnisse der qPCR und zeigten besonders deutlich, welchen Effekt das DT auf das infektiöse Virus hat. In einzelnen Tieren sank der Virustiter in Lunge und Speicheldrüse unter das Detektionslimit.

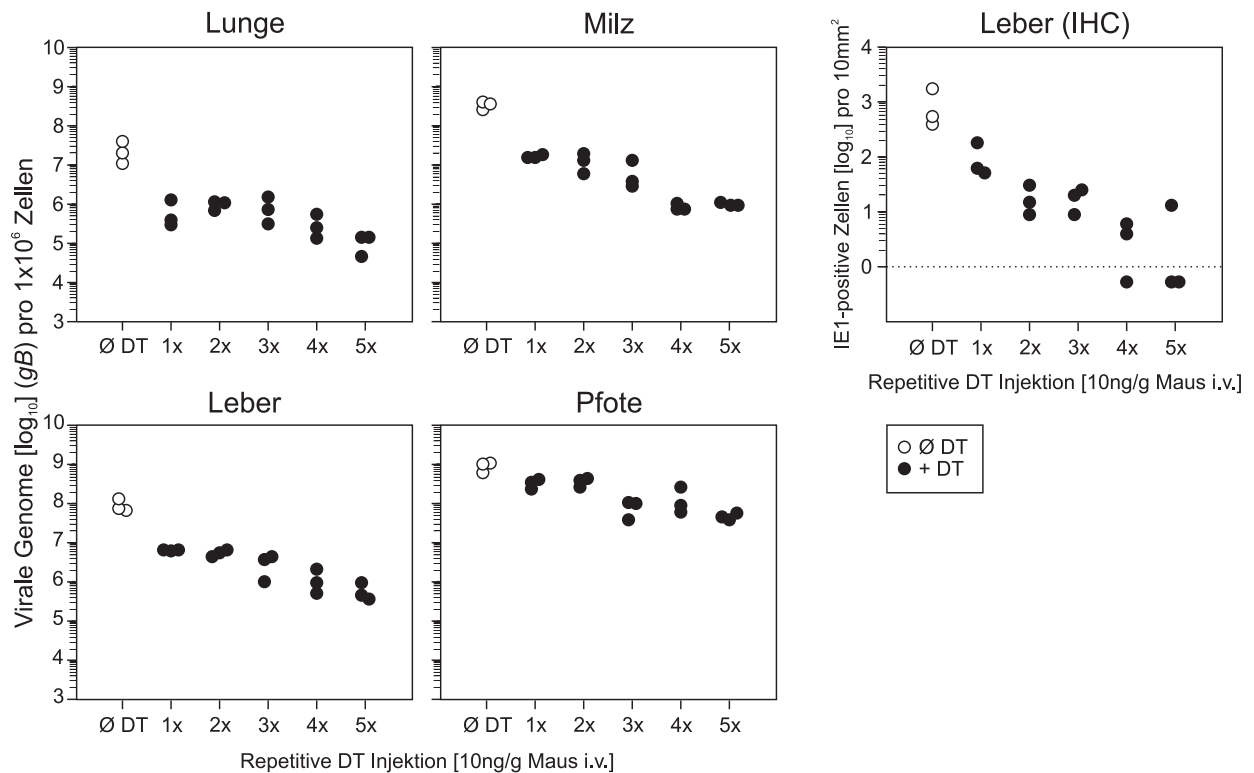


Abb. 3.45: Einfluss einer repetitiven i.v. DT-Injektion mit 10ng DT/g Maus auf die virale DNA-Load der mCMV_ΔIE2DTR akut infizierten Tiere. BALB/c-Mäuse wurden bestrahlt und mit mCMV_ΔIE2DTR akut infiziert. Nach der Infektion wurden die Tiere bis zu fünfmal i.v. mit 10ng DT/g Maus behandelt. Die Organentnahme bei jeweils drei Mäusen pro Gruppe erfolgte 10 Tage nach der Infektion. Gezeigt ist die virale DNA-Load in verschiedenen Organen, ermittelt durch eine M55- (*gB*) spezifische qPCR und Normierung auf 1×10^6 Zellen durch eine *pthrp*-spezifische qPCR, sowie die Zahl der IE1-positiven Zellen in der IHC der Leber. Weiße Kreise: DT-unbehandelte Tiere; schwarze Kreise: DT-behandelte Tiere.

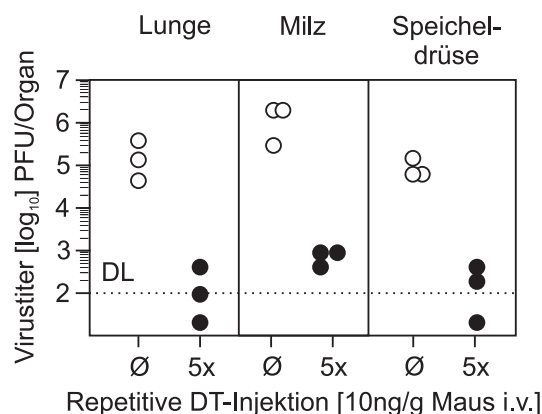


Abb. 3.46: Einfluss einer fünfmaligen i.v. DT-Gabe auf die Virustiter in Lunge, Milz und Speicheldrüse in mCMV_ΔIE2DTR akut infizierten Tieren. BALB/c-Mäuse wurden bestrahlt und mit mCMV_ΔIE2DTR akut infiziert. Gezeigt sind die Virustiter in Lunge, Milz und Speicheldrüse nach fünfmaliger (6h, 22h, 38h, 54h und 70h nach Infektion) i.v. DT-Gabe von 10ng/g Maus, entnommen an Tag 10 p.i.. Weiße Kreise: DT-unbehandelte Tiere; schwarze Kreise: DT-behandelte Tiere. Die Nachweisgrenze (DL) des Assays liegt bei 1×10^2 PFU pro Organ (gepunktete Linie).

Schlussfolgerung:

Die Versuche an akut mit mCMV_ΔIE2DTR infizierten Mäusen haben gezeigt, dass eine repetitive DT-Gabe einer subletalen DT-Dosis effektiver in der Auslöschung von Virusgenomen ist als eine einmalige Applikation einer hohen DT-Dosis. Dies führte zu dem Entschluss, die folgenden Versuche an latent infizierten Tieren unter folgenden Bedingungen durchzuführen: ausgehend von der ersten DT-Gabe folgen weitere vier Applikationen mit jeweils 10ng DT/g Maus i.v. in einem Abstand von jeweils 16h (s. Abb. 3.49).

3.8 Konditionale Depletion von latenten Virusgenomen durch DT in latent infizierten Mäusen

Versuche mit akut infizierten Tieren haben gezeigt, dass während der Infektion *DTR*-Transkripte in den untersuchten Organen transkribiert werden und der DTR an der Oberfläche exprimiert wird, da die Zellen suszeptibel für das DT wurden. So konnte die virale DNA-Replikation auch in akut infizierten Tieren durch eine repetitive DT-Behandlung verhindert werden, wodurch die Funktionalität des DTR auch *in vivo* bestätigt wurde. Im folgenden Kapitel soll daher geklärt werden, ob auch in mCMV-IE1L176A_ΔIE2DTR latent infizierten Tieren *DTR*-Transkripte nachweisbar sind und ob folglich die Möglichkeit besteht, die Anzahl an latenten viralen Genomen zu reduzieren. Dieser Versuch sollte, in Kombination mit den Ergebnissen der *limiting dilution*-Titration (s. 3.8.5.1), durch die die Anzahl an viralen Genomen in einer latent infizierten Zelle berechnet werden kann, ermöglichen, die *period prevalence*, d.h. die Reaktivierungshäufigkeit über einen längeren Zeitraum, abschätzen zu können.

3.8.1 Überprüfung der Latenz von mCMV-IE1L176A_ΔIE2DTR

Um ausschließen zu können, dass sich in den verwendeten latenten Mäusen 10 Monate nach KMT und Infektion mit mCMV-IE1L176A_ΔIE2DTR (s. 2.7.6) noch produktives Virus in den Lungen befindet, wurden die Lungen gespült, entnommen und diese in einer Organtitration auf produktives Virus untersucht. In keinem der getesteten Tiere war zum Zeitpunkt der Organentnahme produktives Virus nachweisbar, was bedeutet, dass die Tiere eine mCMV-Latenz ausgebildet haben.

3.8.2 Quantifizierung von IE-Transkripten aus Lungenstücken latent infizierter Mäuse

Um während der Latenz virale Genome durch DT reduzieren zu können, muss sich der DTR an der Oberfläche der latent infizierten Zellen befinden, damit diese suszeptibel für das DT werden. Damit das DTR-Protein an der Oberfläche präsentiert werden kann, muss der *ie2*-Promotor aktiv sein und *DTR*-Transkripte exprimieren, da das *DTR*-Gen unter Kontrolle des *ie2*-Promotors steht, der während der Latenz, wie der *ie1*-Promotor, sporadisch aktiv ist. Um dies zu verifizieren bzw. die Zahl der Transkripte quantifizieren zu können, wurde eine RT-qPCR (s. 2.4.15.3) durchgeführt, bei der sowohl ein bereits vorhandener *IE1 in vitro*-Transkript Standard (Kurz *et al.*, 1999), als auch ein *DTR in vitro*-Transkript Standard mitgeführt wurde. Das *in vitro*-Transkript für den *DTR* wurde neu hergestellt (s. 3.8.2.1).

3.8.2.1 Herstellung des *DTR in vitro*-Transkripts

Zur Herstellung des *DTR in vitro*-Transkripts musste zuvor das Plasmid pSP64PolyA⁺_DTR kloniert werden (Plasmidkarte und Sequenz des Plasmids sind im Anhang A.4 zu finden). Dazu wurde durch die Verwendung der *Primer* DTR_for_HindIII und DTR_rev_BamHI ein DTR-Produkt aus dem Plasmid pBS-DTR-SV40pA hergestellt, das sowohl eine *HindIII*-, als auch eine *BamHI*- Schnittstelle an den jeweiligen Enden des *DTR*-Gens enthält. Über diese beiden Schnittstellen wurde das 658bp große DTR-PCR-Produkt in den mit *HindIII* und *BamHI* geschnittenen und dephosphorylierten Vektor pSP64PolyA⁺ kloniert, in elektrokompente DH10B transformiert und auf LB-Agar mit Amp bei 37°C selektioniert. Von den gewachsenen Klonen wurde die DNA isoliert und durch Restriktionsenzymverdau mit *HindIII* und *BamHI* wurde die Insertion des *DTR*-Gens kontrolliert (s. Abb. 3.47). Da *HindIII* nur einmalig im Plasmid pSP64PolyA⁺_DTR schneidet, entstand ein DNA-Fragment mit einer Größe von 3,649kbp, der leere Vektor pSP64PolyA⁺ hatte lediglich eine Größe von 3,030kbp. Durch den Doppel-Restriktionsenzymverdau mit *HindIII* und *BamHI* wurde das PCR-Produkt wieder aus dem Plasmid pSP64PolyA⁺_DTR entfernt und es entstanden zwei Banden mit einer Größe von 3,003kbp und 0,646kbp. Der Doppel-Restriktionsenzymverdau des leeren Vektors ergab ebenfalls zwei Fragmente von 3,003kbp und 27bp Größe. Das 27bp große DNA-Fragment ist in der Gelaufftrennung in Abb. 3.47 nicht zu sehen.

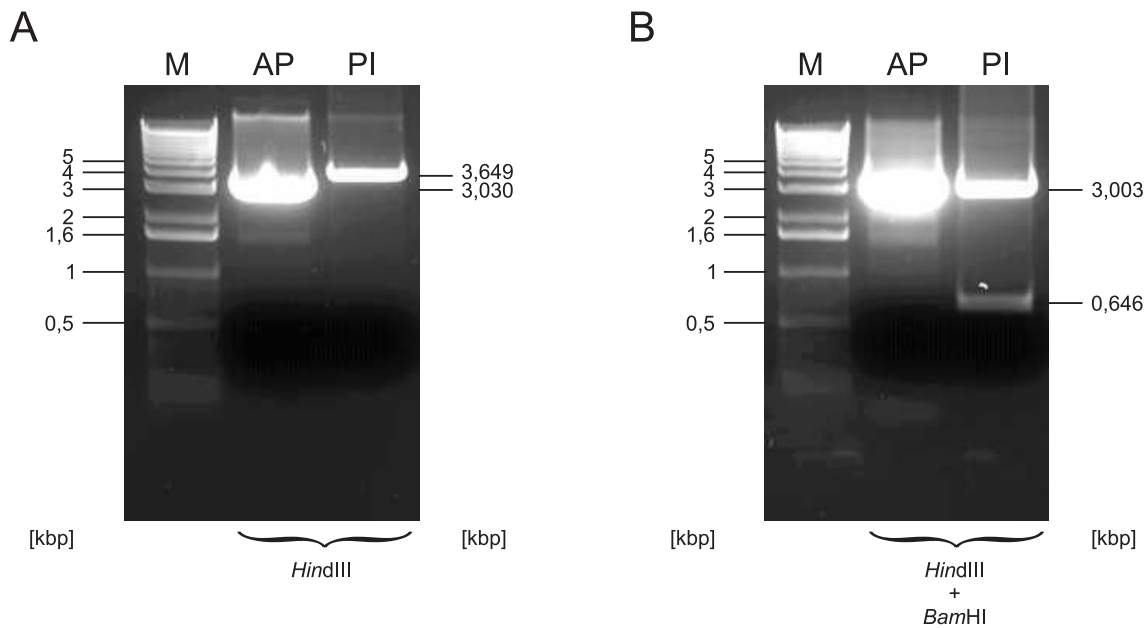


Abb. 3.47: Gelelektrophoretische Auftrennung des Plasmids pSP64PolyA⁺_DTR nach Restriktionsenzymverdau. Gelelektrophoretische Auftrennung des Plasmids pSP64PolyA⁺_DTR nach Restriktionsenzymverdau mit A) *Hind*III bzw. B) *Hind*III und *Bam*HI. Nach dem Restriktionsenzymverdau mit *Hind*III ergab sich für das Ausgangsplasmid (AP) pSP64PolyA⁺ ein einzelnes Fragment von 3,030kbp Größe, bei insertierter *DTR*-Sequenz in pSP64PolyA⁺_DTR (Plasmid + Insert (PI)) ein Fragment von 3,649kbp Größe. Durch den Doppel-Restriktionsenzymverdau mit *Hind*III und *Bam*HI ergaben sich zwei Fragmente der Größe 3,003kbp und 27bp für das AP und zwei Fragmente mit 3,003kbp und 0,646kbp bei vorhandener *DTR*-Sequenz (PI). Spur M, 1kbp DNA-Längenstandard; AP, Ausgangsplasmid pSP64PolyA⁺; PI, Plasmid pSP64PolyA⁺_DTR zur Herstellung des *DTR in vitro*-Transkripts.

Von dem ausgewählten Klon wurde die linearisierte Plasmid-DNA (Linearisierung mit *Sma*I) in die *in vitro*-Transkription eingesetzt und diese wie im Protokoll (s. 2.4.15.2) beschrieben durchgeführt. Um die *in vitro*-Transkripte als externen Standard in der RT-qPCR (s. 2.4.15.3) einsetzen zu können, wurde die RNA-Konzentration bestimmt und diese auf eine definierte Teilchenzahl von 1×10^{11} Teilchen/ μ l eingestellt.

3.8.2.2 Quantifizierung von *IE1*- und *DTR*-Transkripten

Die Quantifizierung der *IE1*- und *DTR*-Transkripte erfolgte durch eine *IE1*- bzw. *DTR*-spezifische RT-qPCR. Als externen Standard wurden die bereits erwähnten *in vitro*-Transkripte für das *ie1*-Gen (Kurz *et al.*, 1999) und für das *DTR*-Gen (s. 3.8.2.1) mitgeführt.

BALB/c-Mäuse wurden bestrahlt und das Immunsystem mit KMZ der Donor-Mäuse rekonstituiert. 10 Monate nach KMT mit anschließender Infektion mit mCMV-IE1L176A_ΔIE2DTR, wurden die Lungen gespült und in 18 Stücke geteilt. Aus sechs Lungenstücken der rechten Lunge wurde die RNA isoliert und $\frac{1}{10}$ des Elutionsvolumens in die RT-qPCR eingesetzt. Insgesamt wurden die Transkripte von je sechs Lungenstücken aus 10 Tieren quantifiziert. Der Versuchverlauf, sowie die Ergebnisse der RT-qPCR sind in Abb. 3.48 zusammengestellt.

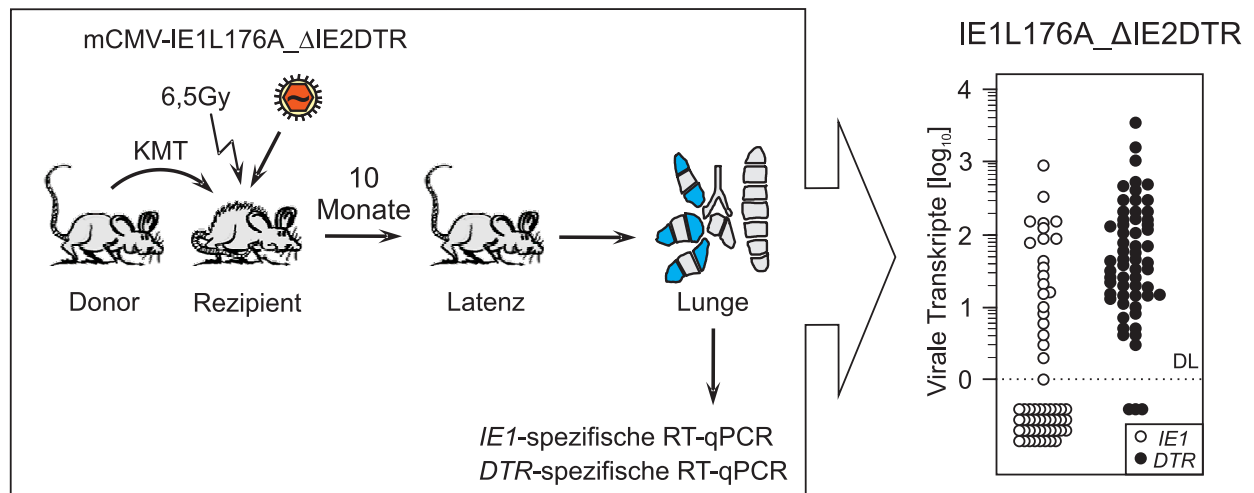


Abb. 3.48: Quantifizierung der IE-Transkripte *IE1* und *DTR* in mCMV-IE1L176A_ΔIE2DTR latent infizierten Mäusen. BALB/c-Mäuse wurden mit 6,5Gy bestrahlt und das Immunsystem anschließend mit 5×10^6 KMZ der Donor-Mäuse rekonstituiert und die Rezipienten mit 1×10^5 PFU mCMV-IE1L176A_ΔIE2DTR infiziert. 10 Monate nach KMT wurden die Lungen gespült, entnommen und in 18 Stücke geteilt. Gezeigt ist die Zahl der *IE1*- und *DTR*-Transkripte aus sechs Lungenstücken der rechten Lunge (blau dargestellte Lungenstücke). Die Zahl der Transkripte wurde durch *IE1*-spezifische und *DTR*-spezifische RT-qPCR bestimmt. Weiße Kreise: *IE1*-Transkripte; schwarze Kreise: *DTR*-Transkripte.

Wie hier deutlich zu sehen ist, sind bei den latenten Tieren für *IE1*- und *DTR*-Transkripte sowohl positive, als auch negative Lungenstücke detektierbar. In mehr als der Hälfte der Lungenstücke sind keine *IE1*-Transkripte nachweisbar. Die Zahl der *DTR*-Transkripte ist im Vergleich zu den *IE1*-Transkripten leicht erhöht, und weist nur drei Lungenstücke auf, bei denen kein *DTR*-Transkript quantifiziert werden konnte. Die wichtigste Erkenntnis aus diesen Daten ist, dass *DTR*-Transkripte während der Latenz transkribiert werden und somit die Voraussetzung dafür gegeben ist, dass das DTR-Protein an der Oberfläche latent infizierter Zellen exprimiert wird und die Zellen durch DT ausgelöscht werden können.

3.8.3 Konditionale Depletion von latenten mCMV-Genomen durch repetitive DT-Behandlung

Im vergangenen Abschnitt konnte verifiziert werden, dass *DTR*-Transkripte während der Latenz nachweisbar sind und somit die Voraussetzungen geschaffen sind, um auch während der Latenz transkriptionell aktive Zellen mit DT auslöschen zu können. Zur konditionalen Depletion von latenten Virusgenomen wurden BALB/c-Mäuse durch γ -Strahlung (6,5Gy) subletal bestrahlt, das Immunsystem durch i.v. Injektion von 5×10^6 KMZ rekonstituiert und anschließend wurden die Mäuse mit 1×10^5 PFU des rekombinanten Virus mCMV-IE1L176A_ΔIE2DTR in die Hinterpfote infiziert (s. Abb. 3.48). Durch die fehlenden IE1-spezifischen CD8 T-Zellen, verursacht durch die Punktmutation im IE1-Peptid, kommt es zu einer verminderten Immunkontrolle des Virus und die Reaktivierungswahrscheinlichkeit und -häufigkeit steigt, womit der Unterschied der DNA-Load zwischen PBS- und DT-behandelten Tieren deutlicher zu sehen sein sollte. Die spätere Berechnung der Reaktivierungshäufigkeit setzt dabei voraus, dass Genome ausschließlich durch das DT ausgelöscht werden und die PBS-Gruppe somit als Ausgangswert ohne DT-Behandlung zu betrachten ist.

10 Monate nach KMT, nachdem sich Latenz etabliert hatte (s. 3.8.1), wurden die Mäuse fünfmal mit DT ($1 \times 20 \text{ ng/g}$ und $4 \times 10 \text{ ng/g}$ Körpergewicht) bzw. mit PBS, in einem Abstand von 16h i.v., behandelt. 24h nach der letzten DT-Applikation wurden die Lungen gespült, entnommen und die virale DNA-Load in den Lungenstücken 10 und 11 des postkavalen Lobus durch M55- (*gB*) spezifische qPCR bestimmt (s. Abb. 3.49-B). Die virale DNA-Load der einzelnen Lungenstücke des postkavalen Lobus errechnet sich durch den Median der M55- (*gB*) und *pthrp*-spezifischen qPCR-Daten, die in Triplikaten gemessen wurden, und der DNA-Konzentration des Eluats aus den einzelnen Lungenstücken, gemessen in Duplikaten. Wie in Balthesen *et al.* (1994) beschrieben, entsprechen 1×10^6 Zellen einer DNA-Menge von $6 \mu\text{g}$. Somit wurde die Anzahl der gemessenen M55- (*gB*) bzw. *pthrp*-Werte jeweils von der eingesetzten DNA-Menge auf $6 \mu\text{g}$ DNA hochgerechnet. Im Idealfall müssten genau 1×10^6 zelluläre Gene (*pthrp/2*) quantifiziert worden sein. Um geringfügige Ungenauigkeiten der qPCR auszugleichen, wurden die gemessenen M55- (*gB*) Werte mit folgender Formel auf exakt 1×10^6 Zellen berechnet.

$$x \text{ gB (in } 1 \times 10^6 \text{ Zellen)} = \frac{\text{pthrp/2 (in } 6 \mu\text{g DNA)} \times \text{gB (in } 6 \mu\text{g DNA)}}{1 \times 10^6 \text{ Zellen}}$$

Schließlich wurde das geometrische Mittel für die jeweiligen Tiergruppen berechnet. Die Versuchsdurchführung, sowie die Ergebnisse der DNA-Load-Bestimmung der DT- bzw. PBS-behandelten Tiere, sind in Abb. 3.49-A und 3.49-B zusammengefasst.

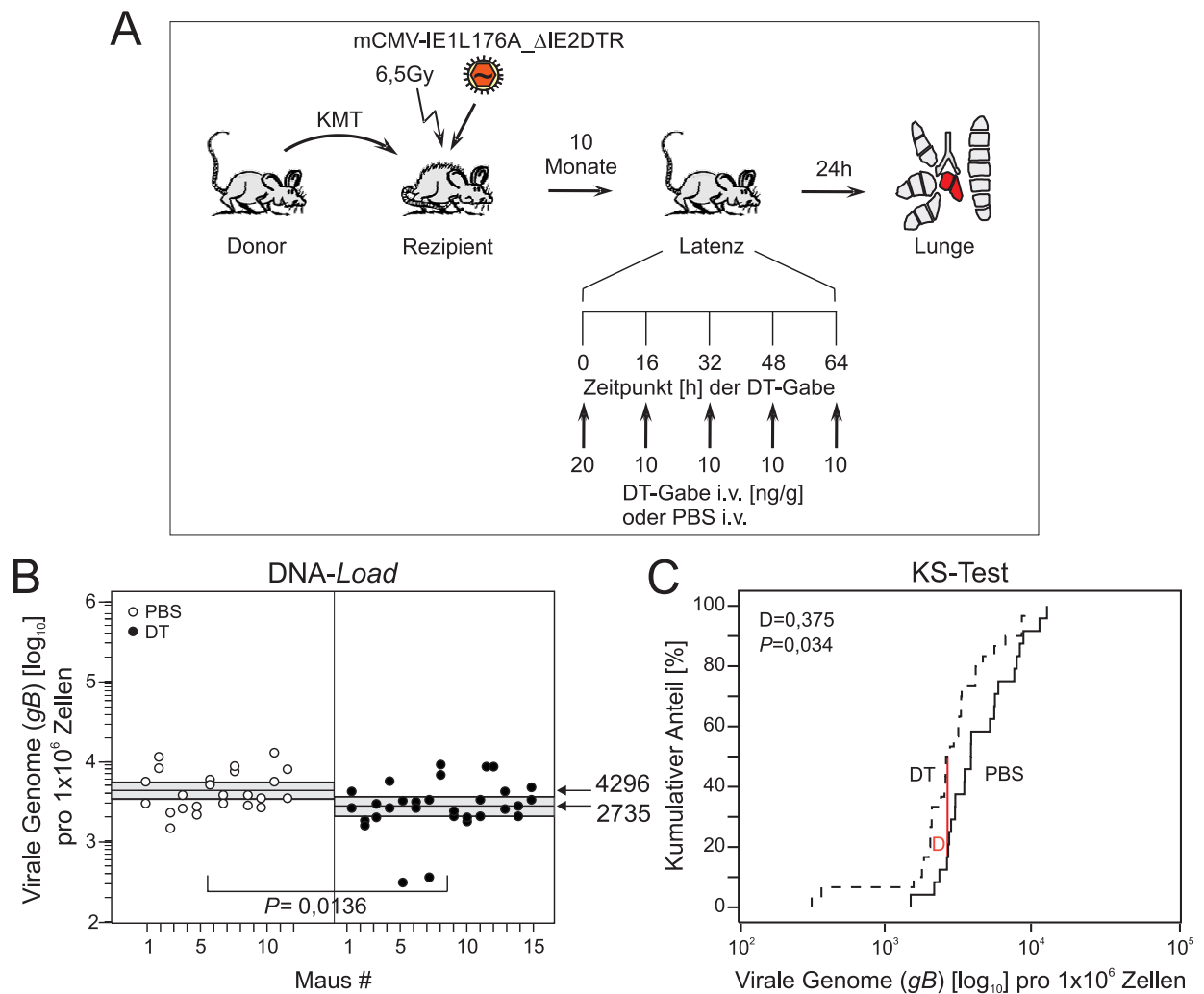


Abb. 3.49: Reduktion der latenten viralen Genome in mCMV-IE1L176A_ΔIE2DTR latent infizierten Mäusen nach fünfmaliger DT-Gabe. A) BALB/c-Mäuse wurden mit 6,5Gy bestrahlt und das Immunsystem anschließend mit 5×10^6 KMZ der Donor-Mäuse rekonstituiert und die Rezipienten mit 1×10^5 PFU mCMV-IE1L176A_ΔIE2DTR infiziert. 10 Monate nach KMT wurden die Mäuse repetitiv mit DT (1×20 ng/g und 4×10 ng/g Maus i.v.) bzw. PBS (i.v.) behandelt. 24h nach der letzten DT-Gabe wurden die Lungen gespült, entnommen und in 18 Stücke geteilt. B) Gezeigt ist die Zahl der viralen latenten Genome in Lungenstück 10 und 11 des postkavalen Lobus (rot dargestellte Lungenstücke). Die Zahl der viralen latenten Genome wurde durch M55- (gB) spezifische qPCR bestimmt und bezieht sich auf 1×10^6 Zellen, normiert auf das *pthrp*-Gen in der qPCR. Die horizontalen Balken geben die geometrischen Mittel der einzelnen Gruppen an, der grau unterlegte Bereich das 95% Konfidenzintervall. Zur statistischen Signifikanzanalyse wurden 24 Lungenstücke aus PBS-behandelten Mäusen (weiße Kreise) zur Genomquantifizierung verwendet, und 30 Lungenstücke aus DT-behandelten Mäusen (schwarze Kreise). C) Gezeigt ist die graphische Darstellung der viralen DNA-Load als kumulativer *Fraction Plot* im Kolmogorow-Smirnow-Test (KS-Test). Auf der X-Achse sind die Werte der viralen DNA-Load für die Lungenstücke 10 und 11 für die jeweiligen Gruppen (PBS-Gruppe: durchgezogene Linie; DT-Gruppe: gestrichelte Linie) gegen den kumulativen Anteil an Proben, die einen bestimmten Wert darstellen, aufgetragen. Der maximale Abstand zweier Kurven (D) ist hier rot eingezeichnet.

Der Versuch zeigt, dass nicht nur in akut infizierten Tieren die Zahl der viralen Genome reduziert werden konnte (s. Abb. 3.45), sondern auch in latent infizierten Mäusen die Anzahl an latenten viralen Genomen durch die repetitive DT-Gabe im Vergleich zu den PBS-behandelten Tieren um ungefähr 36% von durchschnittlich 4.296 Genomen pro 1×10^6 Zellen auf 2.735 Genome pro 1×10^6 Zellen gesenkt werden konnte.

In diesem Experiment wurde statistische Signifikanz erreicht ($P=0,0136$). Um die Signifikanz weiter zu erhöhen und das Ergebnis noch eindeutiger zeigen zu können, haben wir in einem zweiten Versuch sowohl die Zeitspanne zwischen letzter DT-Gabe und Organentnahme, als auch die Zahl der DT-Gaben erhöht. Da jedoch eine achtmalige i.v. DT-Gabe aus technischen Gründen sehr schwer zu realisieren ist, wurde der anschließende zweite Latenz-Versuch mit einer viermaligen i.v. DT-Gabe von $1 \times 20 \text{ ng/g}$ und $3 \times 10 \text{ ng/g}$ Körpergewicht und anschließender viermaliger i.p. DT-Gabe von 30 ng/g Körpergewicht, ebenfalls in einem Abstand von 16h, durchgeführt. Eine Erhöhung der DT-Konzentration auf 30 ng/g Maus war möglich, da Versuche von Marion Grießl (unveröffentlichte Daten) gezeigt haben, dass akut infizierte Mäuse eine fünfmalige DT-Gabe von 30 ng/g Körpergewicht der Maus (i.v.) überleben und sogar die virale DNA-Load in der Lunge akut infizierter Tiere im Vergleich zu einer Konzentration von 10 ng/g Maus noch etwas weiter gesenkt werden konnte. Die Zeitspanne zwischen der letzten DT-Gabe und der Entnahme der Lunge erhöhte sich von 24h auf 72h. Die Lungen wurden vor der Organentnahme gespült und die Lungenstücke 10 und 11 des postkavalen Lobus zur Bestimmung der viralen DNA-Load in der Lunge durch M55- (*gB*) spezifische qPCR verwendet. Das Versuchsprotokoll, sowie die Ergebnisse der DNA-Load-Bestimmung sind in Abb. 3.50-A und 3.50-B dargestellt.

Durch das veränderte Versuchsprotokoll erreichten wir statt einer 36%-igen Reduktion der viralen DNA-Load im ersten Latenz-Versuch (s. Abb. 3.49-B), nun eine Reduktion von durchschnittlich 8.097 Genomen pro 1×10^6 Zellen auf 3.133 Genomen pro 1×10^6 Zellen, was einer Reduktion von 61% entspricht (s. Abb. 3.50-B).

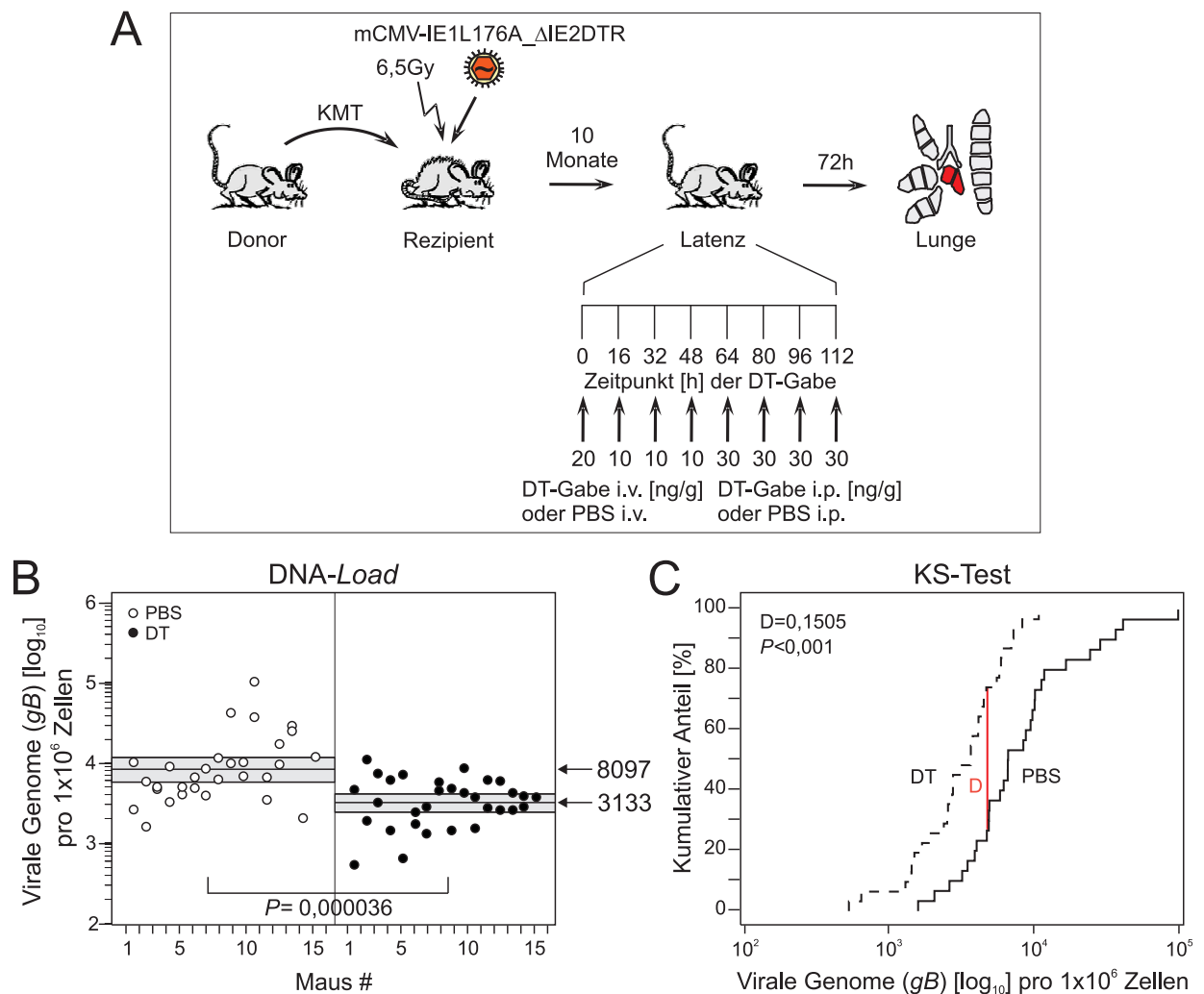


Abb. 3.50: Reduktion der latent viralen Genome in mCMV-IE1L176A_ΔIE2DTR latent infizierten Mäusen nach achtmaliger DT-Gabe. A) BALB/c-Mäuse wurden mit 6,5Gy bestrahlt und das Immunsystem anschließend mit 5×10^6 KMZ der Donor-Mäuse rekonstituiert und die Rezipienten mit 1×10^5 PFU mCMV-IE1L176A_ΔIE2DTR infiziert. 10 Monate nach KMT wurden die Mäuse repetitiv mit DT (1×20 ng/g und 3×10 ng/g Maus i.v.; 4×30 ng/g Maus i.p.) oder PBS (i.v./i.p.) behandelt. 72h nach der letzten DT-Gabe wurden die Lungen gespült, entnommen und in 18 Stücke geteilt. B) Gezeigt ist die Zahl der viralen latenten Genome in Lungenstück 10 und 11 des postkavalen Lobus (rot dargestellte Lungenstücke). Die Zahl der viralen latenten Genome wurde durch M55- (*gB*) spezifische qPCR bestimmt und bezieht sich auf 1×10^6 Zellen, normiert auf das *pthrp*-Gen in der qPCR. Die horizontalen Balken geben die geometrischen Mittel der beiden Gruppen an, der grau unterlegte Bereich das 95% Konfidenzintervall. Zur statistischen Signifikanzanalyse wurden 30 Lungenstücke aus PBS-behandelten Mäusen (weiße Kreise) zur Genomquantifizierung verwendet und 31 Lungenstücke aus DT-behandelten Mäusen (schwarze Kreise). C) Gezeigt ist die graphische Darstellung der viralen DNA-Load als kumulativer *Fraction Plot* im KS-Test. Auf der X-Achse sind die Werte der viralen DNA-Load für die Lungenstücke 10 und 11 für die jeweiligen Gruppen (PBS-Gruppe: durchgezogene Linie; DT-Gruppe: gestrichelte Linie) gegen den kumulativen Anteil an Proben, die einen bestimmten Wert darstellen, aufgetragen. Der maximale Abstand zweier Kurven (D) ist hier rot eingezeichnet.

Die Berechnung der Signifikanzen der Verteilungen der viralen *Load* erfolgte durch den KS-Test. Der KS-Test gibt an, ob die zugrunde liegenden Verteilungen zweier Datensätze gleich sind, unabhängig davon, ob eine Normalverteilung vorliegt. Zusätzlich werden, wie in den Abb. 3.49-C und Abb. 3.50-C zu sehen ist, die Daten graphisch dargestellt, um die Verteilung der Datensätze besser interpretieren zu können. Hierbei werden auf der X-Achse die Anzahl der viralen Genome pro 1×10^6 Zellen gegen den kumulativen Anteil der Proben, die einen bestimmten Wert erreicht haben, aufgetragen. Ob zwei Datensätzen die gleiche Verteilung zugrunde liegt, gibt der *P*-Wert an. Er errechnet sich u.a. durch den maximalen Abstand *D*, den die Kurven im *Comparison Cumulative Fraction Plot* aufweisen. Ein kleiner *P*-Wert ergibt sich dabei aus einem großen Abstand *D*. Je kleiner der *P*-Wert ist, umso größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich die Verteilungen der zwei Gruppen unterscheiden. Ist der *P*-Wert $< 0,05$, sind die Verteilungen der zwei Gruppen signifikant unterschiedlich.

Analysiert man die beiden Latenz-Versuche, ergibt sich zwar für den ersten Latenz-Versuch (s. Abb. 3.49-C) auch bereits ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Verteilungen der PBS- und der DT-behandelten Tiere mit einem *P*-Wert von 0,0136, jedoch liegen die beiden Graphen noch dicht beieinander. Für den zweiten Latenz-Versuch unter veränderten Versuchsbedingungen (s. Abb. 3.50-C) zeigt die graphische Darstellung des KS-Tests einen deutlich größeren Abstand der beiden Graphen für PBS- und DT-behandelte Tiere. Die Berechnung des maximalen Abstands *D* ergibt hier einen *P*-Wert von $< 0,001$, d.h. die Verteilung der beiden Gruppen ist mit einer Wahrscheinlichkeit von $< 0,001$ gleich und macht nochmal die signifikante Senkung der latenten Genome durch die optimierte DT-Behandlung im zweiten Latenz-Versuch deutlich.

Um sicherzustellen, dass die signifikante Reduktion der viralen DNA-*Load* ausschließlich auf die DT-Behandlung zurückzuführen ist, wurden folgende Berechnungen durchgeführt. Zum einen wurden die Effizienzen der *real-time* PCRs zur Quantifizierung des zellulären *pthrp*-Gens miteinander verglichen. Durch die Berechnung der *pthrp*-Werte pro $6 \mu\text{g}$ DNA wurde festgestellt, dass die PCR in beiden Gruppen (PBS- und DT-behandelte Tiere) gleich effizient war (s. Abb. 3.51-A mit einem *P*-Wert von $P=0,9559$) und die quantifizierten *pthrp*-Werte wie erwartet (Balthesen *et al.*, 1994) in einem Bereich um 1×10^6 zelluläre Genome pro $6 \mu\text{g}$ DNA liegen (s. Abb. 3.51-A). Zum anderen wurde in einer zweiten Berechnung festgestellt, dass die Anzahl an quantifizierten *pthrp*-Werten beider Gruppen mit einem *P*-Wert von $P=0,7933$ gleich sind (s. Abb. 3.51-B), d.h. es wurden zur Berechnung der viralen DNA-*Load* die gleiche Anzahl an Zellen verwendet und somit ist die Reduktion der DNA-*Load* in der DT-Gruppe auf die DT-Behandlung zurückzuführen. Verdeutlicht wurden die gleichen Zellzahlen und die gleichen PCR-Effizienzen wie zuvor durch den KS-Test, der für beide Tests eine hohe Signifikanz berechnete (s. Abb. 3.51-A und 3.51-B jeweils rechts).

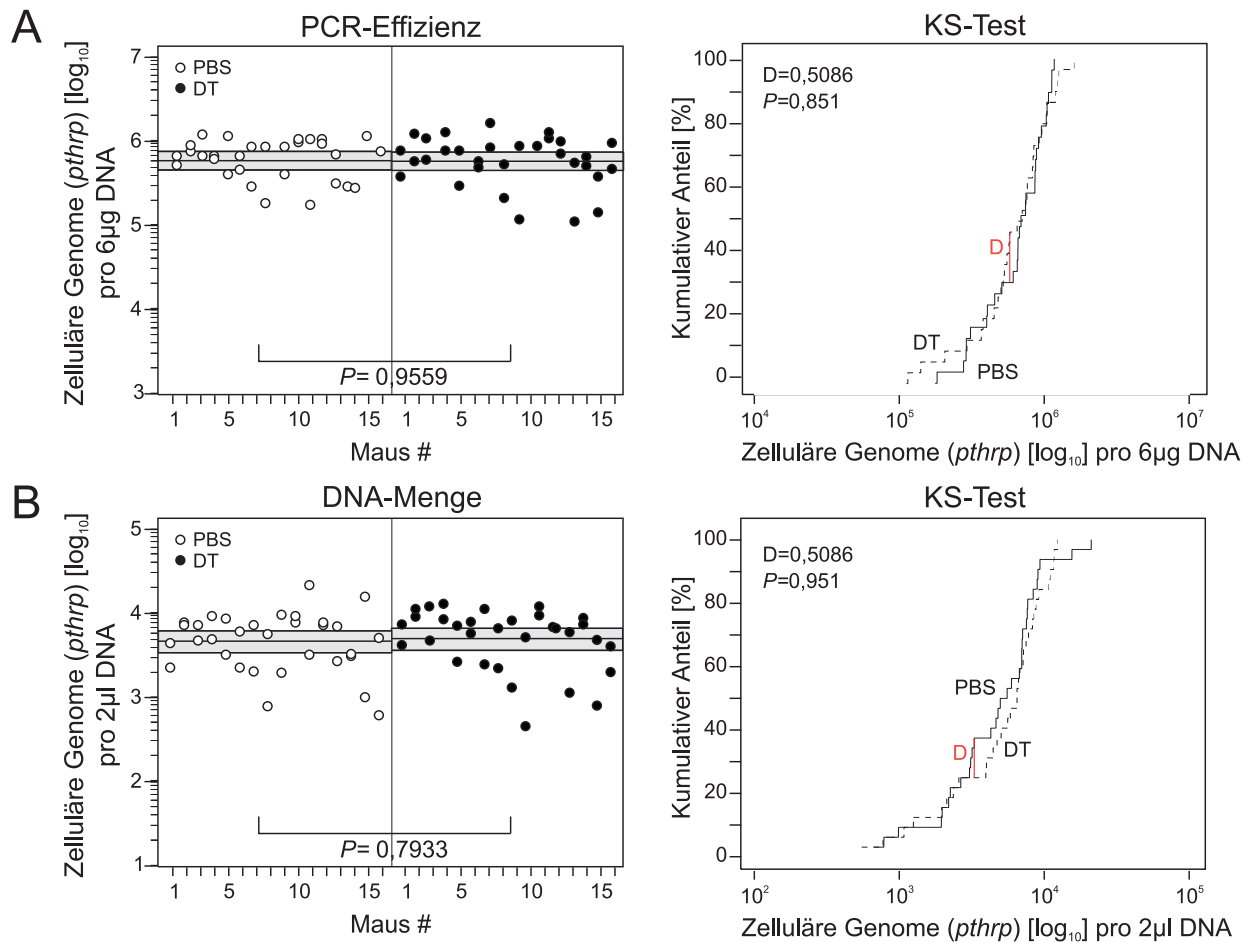


Abb. 3.51: Signifikanzberechnung der PCR-Effizienz und der eingesetzten DNA-Menge zur Bestimmung der viralen DNA-Load in mCMV-IE1L176A_ΔIE2DTR latent infizierten Mäusen nach achtmaliger DT-Gabe. Gezeigt ist A) die Zahl der zellulären Genome pro 6µg DNA aus den Lungenstücken 10 und 11, sowie B) die Anzahl der zellulären Genome in einem 2µl-Aliquot eluierter DNA aus den gleichen Lungenstücken für PBS- und DT-behandelte Tiere. Die Zahl der zellulären Genome wurde durch *pthrp*-spezifische qPCR bestimmt. Die horizontalen Balken geben die geometrischen Mittel der beiden Gruppen an, der grau unterlegte Bereich das 95% Konfidenzintervall. Zur statistischen Signifikanzanalyse wurden 32 Lungenstücke aus PBS-behandelten Mäusen (weiße Kreise) zur Genomquantifizierung verwendet und 32 Lungenstücke aus DT-behandelten Mäusen (schwarze Kreise). Auf der jeweils rechten Seite sind die *pthrp*-Werte graphisch als kumulativer *Fraction Plot* im KS-Test dargestellt. Auf der X-Achse des kumulativen *Fraction Plots* sind die Werte der zellulären Genome (*pthrp*) für die jeweiligen Gruppen gegen den kumulativen Anteil an Proben, die einen bestimmten Wert darstellen, aufgetragen. Der maximale Abstand der zwei Kurven (D) ist hier rot eingezeichnet. PBS-Gruppe: durchgezogene Linie; DT-Gruppe: gestrichelte Linie.

3.8.4 Virusreaktivierung aus Lungenstücken latent infizierter Mäuse

Inwieweit die DT-Behandlung und die damit verbundene Reduktion der viralen DNA-Load auch einen Einfluss auf die Reaktivierung des Virus aus Lungenexplantatkulturen hat, wurde ebenfalls im zweiten Latenz-Versuch untersucht. Die linke Lunge jedes Tieres (in Abb. 3.52 grün markiert) wurde hierzu in sieben Stücke geteilt und die Lungenexplantate sofort in Kulturmedium überführt. Über einen Zeitraum von 10 Wochen wurde jede Woche ein Teil des Überstandes entnommen und die Virusproduktivität durch einen Plaque-Assay bestimmt. Die Versuchsdurchführung und die Ergebnisse des Plaque-Assays sind in Abb. 3.52 zusammengestellt.

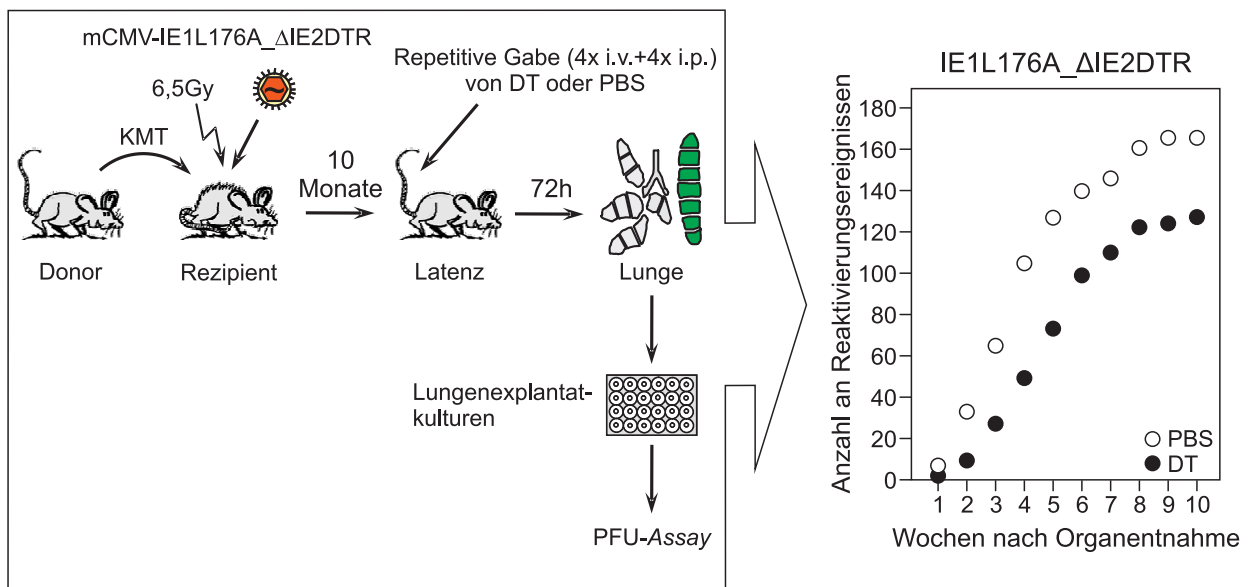


Abb. 3.52: Reaktivierung von mCMV-IE1L176A_ΔIE2DTR aus latent infizierten Lungenexplantatkulturen nach repetitiver DT-Gabe. BALB/c-Mäuse wurden mit $6,5\text{Gy}$ bestrahlt und das Immunsystem anschließend mit 5×10^6 KMZ der Donor-Mäuse rekonstituiert und die Rezipienten mit 1×10^5 PFU mCMV-IE1L176A_ΔIE2DTR infiziert. 10 Monate nach KMT wurden die Mäuse repetitiv mit DT ($1 \times 20\text{ng/g}$ und $3 \times 10\text{ng/g}$ Maus i.v.; $4 \times 30\text{ng/g}$ Maus i.p.) oder PBS (i.v./i.p.) behandelt. 72h nach der letzten DT-Gabe wurden die Lungen gespült, entnommen und in 18 Stücke geteilt. Über einen Zeitraum von 10 Wochen wurde wöchentlich ein Teil des Überstandes zur Ermittlung der Virusproduktivität mittels Plaque-Assay entnommen. Gezeigt ist die Zahl der tatsächlichen Reaktivierungsereignisse in den Lungenstücken 12 bis 18 der linken Lunge jedes Tieres (grün dargestellte Lungenstücke), errechnet mit Hilfe der Poisson-Verteilung an positiven und negativen Lungenstücken eines Individuums über den angegebenen Zeitraum. In diesem Versuch wurden 16 PBS-behandelte Tiere (weiße Kreise), und 16 DT-behandelte Tiere (schwarze Kreise) eingesetzt.

Die Ergebnisse des Reaktivierungsversuchs (s. Abb. 3.52) zeigen deutlich, dass DT nicht nur eine Reduktion der latenten viralen Genome verursacht, sondern vielmehr auch zu einer verminderten Virusreaktivierung aus den latent infizierten Lungenstücken nach repetitiver DT-Gabe führt. Es ist wichtig zu erwähnen, dass aufgrund der Poisson-Verteilung von Reaktivierungen in

jedem Lungenexplantat eine positive Explantatkultur mehr als ein Reaktivierungsereignis bedeuten kann, sodass die gezeigte Anzahl an Reaktivierungsereignissen die tatsächliche Anzahl an positiven Kulturen übersteigt. Die Ergebnisse der tatsächlich positiv getesteten Kulturen sind im Anhang A.5 zu sehen. Für jeden Zeitpunkt wurde hierbei die Zahl an Reaktivierungen durch die ermittelte Zahl an negativen Kulturen $f(0) = e^{-\lambda}$, entsprechend der folgenden Formel berechnet (vergleiche Böhm *et al.*, 2009):

$$\Sigma F(n) = \frac{\lambda}{n} \times F(n - 1)$$

3.8.5 Abschätzung der Reaktivierungshäufigkeit latenter viraler Genome in latent infizierten Lungen

Um die Reaktivierungshäufigkeit latenter viraler Genome in latent infizierten Zellen in seiner Dynamik zu untersuchen, musste die Anzahl an viralen Genomen pro latent infizierter Zelle bestimmt werden. Mit Hilfe dieser Annahme und der ermittelten Reduktion der viralen DNA-Load in DT-behandelten Tieren im Vergleich zu den PBS-behandelten Tieren kann abgeschätzt werden, wie viele Zellen in einem bestimmten Zeitraum MIE-Genexpression aufwiesen.

3.8.5.1 Bestimmung der Frequenz latent infizierter Lungenzellen

Zur Bestimmung der Frequenz latent infizierter Lungenzellen aus latent infizierten Tieren wurden die Lungenzellen isoliert und die daraus aufgereinigte DNA in eine *limiting dilution*-Titration eingesetzt. Anhand der negativen Replikate der Verdünnungsreihe kann so die *Most Probable Number* (MPN) und das 95%-Konfidenzintervall latent infizierter Lungenzellen berechnet werden. Die MPN gibt die Anzahl latent infizierter Lungenzellen pro 1×10^6 Zellen an. Bei bekannter viraler DNA-Load in der Lunge kann daraus die Anzahl viraler Genome in einer latenten Zelle ermittelt werden.

Eine Lunge aus latent infizierten Mäusen wurde entnommen, daraus eine Einzelzellsuspension hergestellt (s. 2.2.8) und die Zellzahl bestimmt. Die Zellsuspension wurde auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt und in einer \log_2 -Verdünnung titriert. Von jeder Verdünnungsstufe wurden zwölf Replikate à 40 μ l entnommen, d.h. es wurden $2,5 \times 10^3$ Zellen in der kleinsten Verdünnung bzw. 312 Zellen in der höchsten Verdünnung verwendet. Aus den jeweiligen Replikaten wurden unter Zusatz von 1 μ g *carrier*-DNA die DNA isoliert (s. 2.4.4.6) und diese anschließend gefällt (s. 2.4.4.8). Die DNA wurde in 5 μ l Tris/HCl (pH 8,0) aufgenommen und der komplette Ansatz in eine M55- (*gB*) spezifische qPCR (s. 2.4.14) eingesetzt und die Anzahl viraler Genome bestimmt. Die virale DNA-Load in der Lunge wurde aus Lungenstück 10 und 11 des postkavalen Lobus quantifiziert, welche im Median $7,862 \times 10^3$ Virusgenome pro 1×10^6 Zellen betrug. Es

wurden hier zwölf Replikate der jeweiligen Verdünnungsstufe von $2,5 \times 10^3$, $1,25 \times 10^3$, 625 und 312 Zellen quantifiziert. Für die Berechnung der MPN wurden alle Ansätze, welche vor Zyklus 40 anstiegen, als positiv gewertet. Es ergibt sich folgende Verteilung negativer Ansätze: 6/12 für 312 Zellen, 5/12 für 625 Zellen, 5/12 für $1,25 \times 10^3$ Zellen und 3/12 für $2,5 \times 10^3$ Zellen.

Tab. 3.3: Limiting dilution-Quantifizierung latent infizierter Lungenzellen

Replikat	$2,5 \times 10^3$ Zellen	$1,25 \times 10^3$ Zellen	625 Zellen	312 Zellen
1	$1,85 \times 10^0$	$2,51 \times 10^{-2}$	$2,56 \times 10^0$	0
2	$4,57 \times 10^{-1}$	$1,82 \times 10^{-1}$	$6,90 \times 10^{-1}$	2,39
3	$5,73 \times 10^0$	$5,43 \times 10^0$	0	$8,92 \times 10^{-4}$
4	$1,12 \times 10^{-3}$	$4,10 \times 10^{-1}$	$3,08 \times 10^1$	$1,97 \times 10^0$
5	$3,36 \times 10^{-1}$	$3,01 \times 10^{-3}$	$3,03 \times 10^0$	$2,79 \times 10^{-2}$
6	$8,22 \times 10^{-1}$	$4,46 \times 10^{-1}$	$1,28 \times 10^0$	$4,11 \times 10^{-2}$
7	$2,00 \times 10^0$	0	$6,01 \times 10^1$	$1,37 \times 10^0$
8	0	$1,82 \times 10^0$	0	$1,64 \times 10^{-1}$
9	$1,72 \times 10^0$	$2,23 \times 10^0$	0	0
10	0	0	$5,52 \times 10^1$	$1,04 \times 10^0$
11	$1,83 \times 10^{-1}$	$1,82 \times 10^{-2}$	0	$1,12 \times 10^0$
12	$4,08 \times 10^0$	$2,91 \times 10^0$	0	0
1	36,81	42,40	35,84	–
2	38,20	39,54	37,78	35,98
3	34,54	34,62	–	47,31
4	46,90	38,36	32,18	36,26
5	38,64	45,47	35,60	42,37
6	37,35	38,24	36,86	41,81
7	36,06	–	31,20	36,79
8	–	36,20	–	39,83
9	36,28	35,91	–	–
10	–	–	31,33	37,18
11	39,52	42,87	–	37,08
12	35,03	35,52	–	–

Lungenzellen wurden von $2,5 \times 10^3$ bis 312 Zellen pro Ansatz zu jeweils zwölf Replikaten \log_2 titriert und die Anzahl viraler Genome durch M55- (*gB*) spezifische qPCR quantifiziert. Die absoluten Werte der Quantifizierung aller Replikate pro Titrationsstufe sind oben dargestellt, die korrespondierenden C_T -Werte unten. Positive Werte: schwarz; negative Werte: rot.

Aus der Anzahl negativer Replikate (in Tab. 3.3 rot markiert) wurde die MPN und deren 95%-Konfidenzintervall latent infizierter Lungenzellen berechnet (s. Abb. 3.53). Die Berechnung der MPN ergab einen Wert von 1.124, was bedeutet, dass sich eine latent infizierte Zelle in 1.124 Lungenzellen befindet, demnach 890 latent infizierte Zellen in 1×10^6 Lungenzellen. Das 95%-Konfidenzintervall ergab Grenzen von 743 bis 1.702 Zellen, woraus sich Werte von 588 bis 1.345 latent infizierten Zellen pro 1×10^6 Lungenzellen errechneten. Mit Hilfe der bekannten DNA-Load kann durch die Anzahl latent infizierter Zellen abgeschätzt werden, wie viele virale Genome sich in einer latent infizierten Zelle befinden. Bei einer viralen DNA-Load von $7,862 \times 10^3$ Virusgenomen pro 1×10^6 Zellen, befinden sich demnach 9 Virusgenome in einer latent infizierten Zelle. Die Grenzen des 95%-Konfidenzintervalls ergaben Werte zwischen 6 und 13 latenten Virusgenomen pro Zelle.

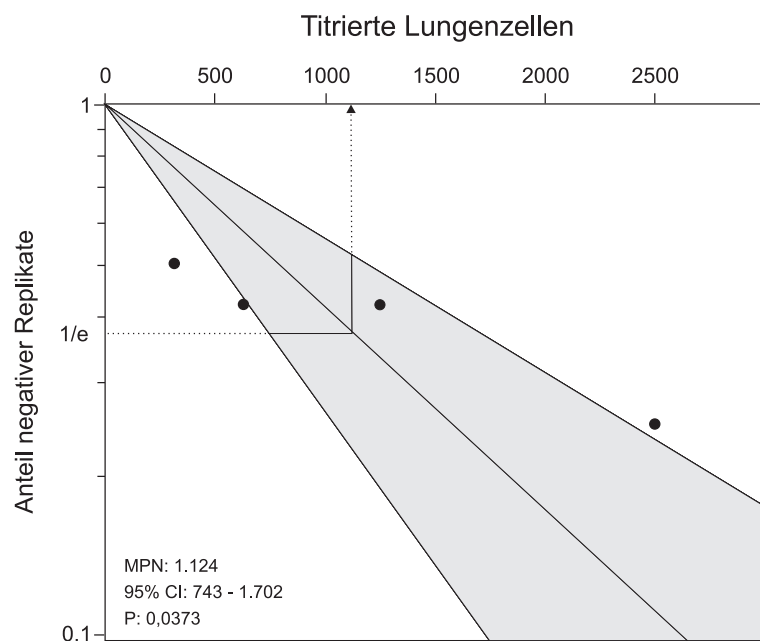


Abb. 3.53: Limiting dilution-Titration für isolierte Lungenzellen. Aus der Lunge einer latent infizierten Maus wurden die Lungenzellen isoliert, auf eine definierte Zellzahl eingestellt und \log_2 titriert. Von den einzelnen Titrationsstufen wurden jeweils zwölf Replikate angefertigt. Aus den einzelnen Ansätzen wurde die DNA isoliert und der komplette Ansatz in eine M55- (*gB*) spezifische qPCR eingesetzt. Die experimentell bestimmte Anzahl negativer Replikate wurde in die *limiting dilution*-Berechnung eingesetzt. Dargestellt sind die Titrationsstufen von 2.500 bis 312 Zellen pro Ansatz. Aus der Verteilung der negativen Werte wurde eine MPN von 1.124 mit einem 95%-Konfidenzintervall (CI) (grau unterlegt) von 743 bis 1.702 errechnet.

3.8.5.2 Berechnung der Reaktivierungshäufigkeit

Beruhend auf den Daten zur Reduktion der viralen DNA-Load und der Bestimmung der Anzahl an viralen Genomen in einer latent infizierten Zelle, kann eine Abschätzung der MIE-Genexpression während der Latenz getroffen werden. Im ersten Latenz-Versuch konnte im Zeitraum von 88h die DNA-Load von 4.269 Genomen auf 2.735 Genome pro 1×10^6 Zellen reduziert

werden. Dies entspricht laut der folgenden Formel einer Auslöschungsrate von 0,505% pro Stunde, vorausgesetzt die Auslöschung der Zellen bzw. die Reduktion der Genome folgt einer fallenden Exponentialfunktion.

$$P(\text{Prozent Auslöschung pro Stunde}) = 100 \times \left[1 - \left(\frac{c(t_2)}{c(t_1)} \right)^{\frac{1}{(t_2-t_1)}} \right]$$

t_1 , Zeitpunkt vor der DT-Behandlung ($t=0$); t_2 , Dauer der DT-Behandlung bis zur Organentnahmen [h];

$c(t_1)$, virale DNA-Load der PBS-Gruppe; $c(t_2)$, virale DNA-Load der DT-Gruppe

Für den zweiten Latenz-Versuch mit veränderten Versuchsbedingungen lässt sich durch die Abnahme von 8.097 Genomen auf 3.133 Genome pro 1×10^6 Zellen in einem Zeitraum von 184h, eine Auslöschungsrate von 0,515% pro Stunde errechnen. Der zweite Versuch mit veränderten Versuchsbedingungen bestätigte durch die gleiche Zerfallsrate die Tendenz des ersten Versuchs.

Um die Auslöschung auf die gesamte Lunge hochrechnen zu können, muss berücksichtigt werden, dass sich eine latent infizierte Zelle in 1.124 Lungenzellen befindet, das bedeutet, es befinden sich 53.381 latent infizierte Zellen in einer Lunge mit etwa 6×10^7 Lungenzellen. Dies entspricht bei 9 Genomen pro latent infizierter Zelle einer Zahl von 480.429 latenten Genomen.

Mit Hilfe der Auslöschungsrate von 0,505% pro Stunde im ersten bzw. 0,515% pro Stunde im zweiten Latenz-Versuch kann berechnet werden, wie viele Genome in einem bestimmten Zeitintervall ausgelöscht wurden. In dem getesteten Zeitraum von 184h wurden durchschnittlich 1.000 bis 2.500 latente virale Genome pro Stunde ausgelöscht, was bei 9 latenten Genomen pro Zelle ungefähr 110 bis 280 transkriptionell aktiven Zellen entspricht.

Schlussfolgerung:

Über einen Zeitraum von 184h konnten 61% der latenten viralen Genome ausgelöscht werden. Ausgehend von den Ergebnissen der *limiting dilution*-Titration, die angibt, dass sich ungefähr 9 latente virale Genome in einer latent infizierten Lungenzelle befinden, bedeutet dies eine Eliminierung von 0,515% der Zellen bzw. Genome pro Stunde. Da die Zahl der Reaktivierungsereignisse ebenfalls deutlich reduziert werden konnte, zeigt sich eine Korrelation zwischen reduzierter viraler DNA-Load in der Lunge und einer verminderten Virusreaktivierung aus den Lungenstücken.

Kapitel 4

Diskussion

Bei immunsupprimierten Personen, beispielweise bei Empfängern von Organtransplantaten oder AIDS-Patienten, spielt die Reaktivierung von CMV aus der Latenz eine wesentliche Rolle, da diese zum Tod der Patienten führen kann. Wie gezeigt werden konnte, werden während der mCMV-Latenz die Transkriptionseinheiten *ie1/3* und *ie2* des bidirektionalen Genpaars stochastisch und voneinander unabhängig exprimiert (Grzimek *et al.*, 2001). Durch RT-qPCR konnte gezeigt werden, dass die *point prevalence*, also der Anteil exprimierender Genome an der Gesamtheit der latenten Genome, zu einem bestimmten Zeitpunkt sehr gering ist. Die Zahl wird auf ungefähr 10 bis 20 exprimierende Genome pro 1×10^6 latente Genomen festgelegt (Kurz *et al.*, 1999; Grzimek *et al.*, 2001; Simon *et al.*, 2005; zur Übersicht: Reddehase *et al.*, 2008). Die Expression dieser wenigen latenten Genome führt jedoch zur Expansion von IE1-spezifischen CD8 T-Zellen. Aufgrund dessen wurde die Hypothese aufgestellt, dass ein wesentlich größerer Anteil an Genomen MIE-Gene exprimieren muss, auch wenn dies nicht gleichzeitig zu jedem Moment geschieht, aber in einem bestimmten Zeitintervall. In der vorliegenden Arbeit soll daher erstmals mit Hilfe der konditionalen Depletion von mCMV die Zahl der Reaktivierungsereignisse aus der Latenz in einem bestimmten Zeitraum abgeschätzt werden. Dies erforderte die Herstellung eines rekombinanten Virus, mit welchem man die Anzahl an viralen Genomen sowohl während einer akuten Infektion, als auch während der Latenz, konditional und selektiv auslöschen kann.

4.1 Insertion des simian *DTR*-Gens in das mCMV-Genom

Um Virusmutanten mit einer Genomgröße von mehr als 100kbp herstellen zu können, wurde auf die Methode der Zwei-Schritt BAC-Mutagenese zurückgegriffen (Messerle *et al.*, 1997; Borst *et al.*, 1999; Wagner *et al.*, 1999). Diese Methode beruht auf dem Prinzip der homologen Rekombination von BAC-Plasmiden, die das CMV-Genom beinhalten, und einem *shuttle*-Plasmid, das

die Mutation in der entsprechenden Genregion enthält. Nach der Mutagenese der BAC-Plasmide werden permissive Zellen mit der BAC-DNA transfiziert und die BAC-Vektorsequenzen oder Selektionsmarker im Laufe der Virusrekonstitution entfernt.

In dieser Arbeit sollte mit Hilfe der Zwei-Schritt BAC-Mutagenese das Gen für den simian DTR unter die Kontrolle des *ie2*-Promotors gebracht werden. Das *ie2*-Gen wurde hierfür als idealer Integrationsort ausgewählt, da es sowohl in der akuten Phase der Infektion, als auch während der Latenz exprimiert wird. Die Transkriptionseinheit *ie1/3* wird zwar ebenfalls während der Latenz sporadisch exprimiert, jedoch gibt es mehrere Nachteile bei der Insertion des *DTR*-Gens in diese Genregion. Zum einen wird die Transkriptionseinheit differentiell gespleißt, wodurch zwei Genprodukte entstehen, demzufolge der DTR nicht jedesmal exprimiert werden würde, wenn der Promotor aktiv ist. Zum anderen könnte es sein, dass durch die Insertion des *DTR*-Gens die Transkriptionseinheit nicht mehr richtig gespleißt werden könnte. Hinzu kommt, dass das IE1-Protein eine Transaktivatorfunktion für zelluläre Gene und IE3 ein essentieller Transaktivator für die nachgeschaltete E-Genexpression ist. Würde der DTR statt IE3 exprimiert werden, könnte das Virus in der Phase der akuten Infektion nicht mehr replizieren. Zu beachten ist auch, dass in der Regel während der Latenz kein *Splicing* zum IE3 stattfindet, also auch an dessen Stelle keine *DTR*-Transkripte detektierbar sein würden. Da das *ie2*-Gen dagegen nicht essentiell ist (Cardin *et al.*, 1995; Messerle *et al.*, 1992), sollte die Virusreplikation der *DTR*-Rekombinanten nicht beeinflusst werden. Dass ein Rezeptor für das DT zur Insertion in den MIE-Lokus zur späteren Depletion der Zellen gewählt wurde, hat zwei Gründe. Zum einen sind Maus-Zellen nicht suszeptibel für das Toxin, da einige AS-Austausche in der DT-bindenden Region des DTR die effektive Anheftung des DT und somit seine Wirkung verhindern (Eidels, 1983; Stenmark *et al.*, 1988; Iwamoto und Mekada, 2000). Zum zweiten ist DT ein sehr starkes Toxin. Bereits ein Molekül in der Zelle reicht aus, um diese durch Apoptose auszulöschen (Yamaizumi *et al.*, 1978).

Mit Hilfe der BAC-Mutagenese konnten demnach drei Virusmutanten hergestellt werden, die in BAC-freiem Zustand vorliegen:

1. mCMV_ΔIE2DTR
2. mCMV-IE1L176A_ΔIE2DTR
3. mCMV_ΔIE2DTR-HA

Ist der MIE-Lokus, und somit auch der *ie2*-Promotor, aktiv, sollte das *DTR*-Gen exprimiert und das DTR-Protein an der Oberfläche der mit den *DTR*-Rekombinanten infizierten Zellen präsentiert werden. Diese sollten somit suszeptibel für das DT werden.

4.2 Der DTR wird unter IE-Bedingungen exprimiert

Zu Beginn der Versuche zur konditionalen Depletion von mCMV_ Δ IE2DTR infizierten Zellen wussten wir nicht, wie lange das DT in Zellkultur stabil ist. Um auszuschließen, dass das DT bereits nicht mehr funktional ist, sobald der DTR an der Zelloberfläche ist, mussten Versuche klären, zu welchem Zeitpunkt das DTR-Protein exprimiert wird, um die DT-Gabe daraufhin abzustimmen. Zur Detektion des DTR-Proteins wurden verschiedene Western Blot-Analysen durchgeführt. Zellen wurden mit der mCMV_ Δ IE2DTR-Rekombinanten infiziert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion geerntet. Der Nachweis des DTR mit α -DTR Ak zeigte, dass spätestens 4h nach der Infektion das DTR-Protein vorliegt. Durch die hohe Sequenzhomologie zum simian DTR konnte zwar das DTR-Protein mit dem humanen DTR-Ak detektiert werden, jedoch bestehen zu dem simian DTR strukturelle Unterschiede, die die Ak-Bindung schwächen, wodurch der Ak weniger spezifisch an das Protein bindet. Aufgrund dessen wurde der Versuch mit einer DTR-HA-getagten Rekombinanten wiederholt. Durch die Detektion des HA-tags am C-terminalen Ende des DTR-Proteins mit dem spezifischen α -HA mAk konnte der DTR bereits 2h nach der Infektion nachgewiesen werden, was wiederum die geringe Spezifität des humanen α -DTR Ak bestätigte. Ob sich der DTR zu diesem Zeitpunkt schon an der Zelloberfläche befindet, konnte mit diesem Versuch leider nicht verifiziert werden, da für die Western-Blot Analysen Gesamtzellprotein verwendet wurde.

Um in folgenden Versuchen ebenfalls latente virale Genome auslöschen zu können, ist es essentiell, dass der DTR unter IE-Bedingungen exprimiert wird, da während der Latenz nur die Gene des MIE-Lokus transkriptionell aktiv sind. Durch die Detektion des DTR unter Versuchsbedingungen, die ausschließlich die Transkription der *ie*-Gene erlauben, konnte gezeigt werden, dass der DTR *in vitro* unter IE-Bedingungen exprimiert wird. Es ist somit eine Grundvoraussetzung dafür geschaffen, dass auch während der Latenz der DTR IE exprimiert wird.

Um die Bildung eines DTR-IE2-Fusionsproteins auszuschließen, das eventuell die Funktion des DTR durch eine veränderte Konformation beeinträchtigen könnte, wurde ein Stop-Codon hinter das DTR-Gen kloniert. Zellen wurden mit den verschiedenen Rekombinanten unter IE-Bedingungen infiziert. Durch die Ak-Markierung des IE2-Proteins mit dem α -IE2 Ak konnte weder ein IE2-Protein, noch ein Fusionsprotein von DTR und IE2 nachgewiesen werden.

4.3 Insertion des simian *DTR*-Gens in das mCMV-Genom hat keine Auswirkungen auf die virale Replikation *in vitro* und *in vivo*

Eine Mutation des mCMV-Genoms, v.a. die Insertion ganzer Gene, birgt immer die Gefahr, dass die Virusreplikation beeinflusst wird. Die Mutante pSM3frdie3::GFP+ z.B. ist in ihrem Wachstum durch die Insertion des *egfp*-Gens in das *ie2*-Gen attenuiert (Angulo *et al.*, 2000). Da in der Rekombinanten mCMV_ΔIE2DTR ausgeschlossen wurde, dass sich ein DTR-IE2-Fusionsprotein bildet und auch kein IE2 mehr nachgewiesen werden konnte, galt es zu kontrollieren, ob die Insertion des *DTR*-Gens und das damit verbundene Fehlen des IE2-Proteins, Auswirkungen auf die mCMV-Replikation *in vitro* und *in vivo* hat, bzw. auf die Infektiosität des Virus.

Die Infektiosität der Viren wurde durch das Genom-zu-PFU-Verhältnis ermittelt. Für die in dieser Arbeit verwendeten Viren mCMV_ΔIE2DTR, mCMV-IE1L176A_ΔIE2DTR und mCMV_ΔIE2DTR-HA konnte gezeigt werden, dass diese ein nahezu gleiches Genom-zu-PFU-Verhältnis wie mCMV-WT.BAC und mCMV-WT.Smith von ungefähr 500:1 besitzen, demnach dieselbe Anzahl an viralen Genomen benötigen, um ein infektiöses, Plaque-bildendes Ereignis (PFU) zu verursachen. Da die rekombinanten Viren in einem Bereich von 480:1 bis 890:1 liegen, wurde das von Kurz *et al.* (1997) beschriebene Genom-zu-PFU-Verhältnis für mCMV bestätigt. Die Bestimmung des Genom-zu-PFU-Verhältnisses erfolgte mittels qPCR unter Berücksichtigung des jeweiligen Virustiters.

Auch wenn das Genom-zu-PFU-Verhältnis der rekombinanten Viren vergleichbar zum mCMV-WT.BAC ist, muss die *in vitro*- und die *in vivo*-Replikation der Viren kontrolliert werden, um eine Beeinträchtigung bzw. Attenuierung der Replikation auszuschließen. Die Ergebnisse der Replikationskinetik haben gezeigt, dass alle generierten DTR-Rekombinanten sowohl *in vitro* in permissiven Fibroblasten, als auch *in vivo* in murinen Hepatocyten gleich dem mCMV-WT.BAC replizieren und keine Attenuierung des Virus durch die Insertion des *DTR*-Gens vorliegt. Auch in Lunge, Milz und Speicheldrüse zeigen die rekombinanten Viren vergleichbare Verdopplungszeiten, sowohl durch die gemessenen Virustiter der getesteten Organe, als auch durch die virale DNA-Load der Organe der jeweiligen Virusgruppen. Dieses Ergebnis ist essentiell für die folgenden Versuche in mCMV_ΔIE2DTR infizierten Tieren, da später die Abnahme an viralen Genomen in den DTR-Rekombinanten durch DT mit der DNA-Load des mCMV-WT.BAC in der akuten Infektion verglichen werden sollte. Weiterhin ist es wichtig zu zeigen, dass sich die Rekombinanten wie der mCMV-WT.BAC verhalten, um die Latenz-Versuche, die mit der Rekombinanten mCMV-IE1L176A_ΔIE2DTR durchgeführt werden, auf die Eigenschaften einer latenten mCMV-WT.BAC-Infektion übertragen zu können.

4.4 Dosis-abhängige Inhibition der Virusreplikation durch DT *in vitro*

Die Expression des DTR-Proteins in der mCMV-Rekombinante wurde in mehreren unabhängigen Versuchen bestätigt. Um nun die Funktionalität des DTR zu verifizieren, musste zuerst eine Nachweismethode gefunden werden. Da DT die Proteinsynthese, und somit auch die Virusreplikation hemmt, sollte die Funktionalität durch die blockierte Virusreplikation nachgewiesen werden. Dafür bedarf es jedoch einer DT-Konzentration, die zwar die Replikation der Viren beeinträchtigt, jedoch nicht toxisch für die Indikatorzellen ist. Die mit den DTR-Rekombinanten bzw. dem mCMV-WT.BAC infizierten MEF wurden 6h nach der Infektion mit verschiedenen DT-Konzentrationen behandelt. Ausgehend von den Arbeiten von Chang *et al.* (1989), die zeigen konnten, dass 50% der Proteinsynthese in humanen U937 Zellen, die den humanen DTR enthalten, durch 7,5ng/ml DT gehemmt werden konnte, wählten wir in der vorliegenden Arbeit einen Konzentrationsbereich von 0,01ng/ml bis 1000ng/ml DT.

Die Dosis-abhängige Inhibition der Proteinsynthese der in dieser Arbeit verwendeten MEF nach Infektion mit den Rekombinanten wurde zu zwei Zeitpunkten nach der DT-Gabe kontrolliert. Dazu wurden die Zellen zu einem Zeitpunkt vor der Virusreplikation (12h nach der Infektion) und zu einem Zeitpunkt nach der Virusreplikation (24h nach der Infektion) geerntet und die Zahl der viralen Genome in den infizierten Zellen quantifiziert. Erst ab einer DT-Konzentration von 100ng/ml konnte in allen getesteten Rekombinanten die Virusreplikation komplett verhindert werden. Eine Erhöhung der DT-Konzentration auf 1000ng/ml konnte den hemmenden Effekt des DT auf die Virusreplikation von mCMV_ Δ IE2DTR und mCMV-IE1L176A_ Δ IE2DTR nicht verstärken.

Die Ergebnisse zur Ermittlung der optimalen DT-Konzentration *in vitro* haben gezeigt, dass die virale DNA-Load bei einer DT-Konzentration von 10ng/ml um die Hälfte reduziert werden konnte und die virale Replikation in murinen Fibroblasten durch eine DT-Konzentration von 100ng/ml völlig gehemmt werden konnte. Dieses Ergebnis bestätigte die Arbeiten von Chang und seinen Kollegen (1989), die in einer humanen Zelllinie zeigen konnten, dass 50% der Proteinsynthese bei 7,5ng/ml gehemmt werden. Wie erwartet zeigt die optimale DT-Konzentration zur Inhibierung der Proteinsynthese von murinen Zellen, die den simian DTR exprimieren, und humanen Zellen eine große Übereinstimmung, da die Sequenzen des *DTR*-Gens in Affen und Menschen große Homologie aufweisen (Higashiyama, 1992) und somit die damit verbundene DT-Affinität des DTR gleich stark ist. Da Mäuse resistent gegen das DT sind (Middlebrook und Dorland, 1977), hatte das DT wie erwartet keinen Einfluss auf mCMV-WT.BAC infizierte Zellen. Vero-Zellen, die den simian DTR exprimieren, sind in ihrer Affinität zu DT vergleichbar mit den in dieser Arbeit mCMV_ Δ IE2DTR infizierten MEF, die durch die Virusinfektion ebenfalls den

simian DTR an der Oberfläche präsentieren. Vero-Zellen weisen eine IC_{50} für DT von 4ng/ml auf, das heißt bei dieser Konzentration werden 50% der Proteinsynthese gehemmt. Naglich und Kollegen (1992) dagegen bestimmten die IC_{50} für murine L-M-Zellen auf 1×10^4 ng/ml. Sie sind den mCMV-WT.BAC infizierten Zellen gleichzusetzen, da beide Zelltypen ausschließlich den murinen DTR exprimieren. Dies bedeutet, dass bei Mäusen eine wesentlich höhere DT-Konzentration zur Hemmung der Proteinsynthese benötigt wird als bei Affen und die WT infizierten MEF nicht durch das Toxin ausgelöscht werden können. In der vorliegenden Arbeit wurde zwar nicht die IC_{50} für DT auf Proteinebene ermittelt, jedoch stimmt die IC_{50} von etwa 10ng/ml DT auf der Ebene der viralen DNA-Replikation sehr gut mit der IC_{50} von Vero-Zellen mit 4ng/ml DT und der IC_{50} von humanen Zellen mit 7,5ng/ml überein.

Zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung war lediglich bekannt, welche Halbwertszeit DT in der Zelle aufweist. Yamaizumi und Kollegen (1982) inkubierten Maus L-Zellen mit ^{125}I -gelabeltem DT und lysierten die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach DT-Gabe, um das Cytoplasma vom Kern zu trennen und die Radioaktivität im Cytoplasma zu untersuchen. Die Menge an Radioaktivität für Fragment A hatte sich im Laufe der Inkubation nur wenig verändert, wohingegen die Radioaktivität des B-Fragments rapide mit einer Halbwertszeit von 2h bis 5h abnahm. Nach 16h Inkubation waren nur noch Spuren an Radioaktivität detektierbar (Yamaizumi *et al.*, 1982). Da wir das DT jedoch in Kulturmedium zu den Zellen geben und nicht klar war, wie lange das DT in Kulturmedium stabil ist, wurde das DT zur Bestimmung der optimalen DT-Konzentration *in vitro* 6h nach der Infektion zu den Zellen gegeben, um sicher zu gehen, dass der DTR bereits an der Zelloberfläche präsentiert wird, sobald das DT ins Medium gegeben wird.

Um für spätere Versuche die DT-Stabilität in Kulturmedium zu überprüfen, wurden in dieser Arbeit MEF mit der Virusrekombinanten mCMV_ Δ IE2DTR infiziert und zum Zeitpunkt der Infektion DT zu den Zellen gegeben, das zuvor unterschiedlich lange in Kulturmedium bei 37°C vorinkubiert wurde. 24h nach der Infektion und DT-Gabe wurde die Virusreplikation gemessen. Wie durch diesen Versuch gezeigt werden konnte, ist das DT in Kulturmedium selbst nach 24h Vorinkubation bei 37°C stabil und verhindert die Virusreplikation der DTR-Mutanten und ist demnach funktionell. Für alle weiteren Zellkulturversuche wurde das DT daraufhin direkt zum Zeitpunkt der Infektion zu den Zellen verabreicht.

4.5 DT inhibiert die Proteinsynthese und die Zelle stirbt einen apoptotischen Tod

Die Wirkung des DT beruht auf der Inhibierung des EF2 und verhindert dadurch die Translation (Collier, 1975; Chung und Collier, 1977). Da jedoch im viralen System einige Proteine, wie beispielsweise das IE3-Protein, als Transaktivator funktionieren (Messerle *et al.*, 1992), bzw. wie

pp71 bei hCMV (Mocarski *et al.*, 1996) als autoregulatorische Proteine gelten, war es wichtig, die Auswirkungen der DT-Gabe auch auf die virale Transkription zu untersuchen. Für die Transkriptanalyse wurden MEF infiziert, wie zuvor direkt mit der Infektion mit 100ng/ml DT behandelt und zu verschiedenen Zeitpunkten die RNA aus den Zellen isoliert. Für das *IE1*-Transkript war zu allen getesteten Zeitpunkten kein Unterschied in der Anzahl der Transkripte im Vergleich zwischen DT-behandelten und DT-unbehandelten Zellen zu sehen. Das DT hat demnach keinen Einfluss auf die *IE*-Transkription. Im Western Blot ist dagegen 8h und 24h nach der Infektion und DT-Gabe eine etwas schwächere Bande für IE1 detektierbar als ohne DT-Behandlung. Dies könnte darauf hinweisen, dass zu diesem Zeitpunkt die Hemmung der Proteinsynthese durch die Blockade des EF2 schon begonnen hat. Da es jedoch einige Zeit benötigt, bis der DTR an der Oberfläche infizierter Zellen präsentiert wird und erst dann DT in die Zelle eindringen kann, ist zu frühen Zeitpunkten schon viel IE1-Protein hergestellt worden, welches im Western Blot nachgewiesen werden kann. Der Rückgang der IE1-Proteinmenge 24h nach der Infektion sowohl in DT-behandelten, als auch in DT-unbehandelten Zellen, ist auf das Verhältnis von infizierten zu nicht infizierten Zellen zurückzuführen. Je weiter die Infektion fortschreitet, umso mehr infizierte Zellen lösen sich von der Kulturplatte ab und gelangen in den Überstand, der bei der Präparation der Zelllysate für den Western Blot abgesaugt wird. Es befinden sich somit weniger infizierte Zellen, die IE1-Proteine bilden, im Lysat und die effektive Menge an IE1-Protein im Verhältnis zu den restlichen zellulären Proteinen nimmt ab. Da für die Western Blot-Analysen definierte Mengen an Gesamtzellprotein eingesetzt werden, verringert sich die Menge an detektierbarem IE1-Protein. Dies bedeutet aber gleichzeitig, dass der Unterschied der IE1-Proteinmenge 24h nach der Infektion zwischen DT-unbehandelten und DT-behandelten Zellen deutlich größer sein muss, als durch den Western Blot gezeigt wurde. DT-behandelte Zellen kugeln sich 24h nach der Infektion nicht ab, gehen nicht in den Überstand und verändern dadurch nicht das Verhältnis zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen. Bei allen weiteren getesteten Transkripten (*E1*, *m164*, *M55* (*gB*) und *M86* (*MCP*)) ist analog zu den *IE1*-Transkripten 4h und 8h nach der Infektion kein Unterschied zwischen DT-behandelten und DT-unbehandelten Zellen in der Transkriptmenge zu beobachten. Je später die Transkripte jedoch in der Expressionskaskade transkribiert wurden, umso mehr nahm die Zahl der Transkripte durch die DT-Behandlung ab. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Ergebnissen der Western Blot-Analyse. Werden keine bzw. weniger IE-Proteine hergestellt, kommt es zu einer geringeren Transaktivierung nachgeschalteter Gene, was die Zahl der Transkripte für *E1* und *m164* reduziert. Da die Gene bei mCMV kaskadenartig reguliert sind und die L-Gene nach den E-Genen transkribiert werden, kann dies durch die Hemmung der Translation möglicher e-Transaktivatoren zu einer geringeren Transkription der L-Gene führen. Die wenigen transkribierten L-Transkripte können jedoch durch die DT-Behandlung nicht mehr translatiert werden, wodurch im Western Blot keine M55- (*gB*) bzw. M86- (*MCP*) Proteine mehr detektiert werden können. Dies hat zur Folge, dass die Viren nicht

mehr replizieren können. Es konnte somit bestätigt werden, dass das DT ausschließlich eine direkte Wirkung auf die Proteinsynthese hat und die Transkription nur indirekt bei den späten Transkripten durch die kaskadenartige Genexpression negativ beeinflusst wird.

Dass durch die DT-Behandlung nicht nur die Proteinsynthese der Zelle blockiert wird, sondern auch die virale Proteinsynthese ebenfalls durch DT inhibiert wird, konnte durch die Western Blot-Analysen in dieser Arbeit eindeutig gezeigt werden. Wichtige Strukturproteine wie M55 (gB) und M86 (MCP) wurden nicht mehr exprimiert und die Bildung neuer Viren wurde verhindert. Wichtig ist es zudem zu beweisen, dass die Zelle in Apoptose geht. Morimoto und Bonavida (1992) konnten durch DNA-Fragmentierung und Zelllyse zeigen, dass durch DT nicht nur die Hemmung der Proteinsynthese, sondern auch Apoptose induziert wird, wenngleich der genaue Mechanismus noch nicht geklärt werden konnte. Für die folgenden Latenz-Versuche ist es essentiell, dass die Zelle in Apoptose geht und nicht nur die Proteinsynthese gehemmt wird. Nur wenn eine transkriptionell aktive Zelle während der Latenz den DTR präsentiert und durch die DT-Gabe apoptotisch wird, kommt es zu einem Verlust an latenten viralen Genomen und die reduzierte Anzahl der latenten Genome nach der DT-Behandlung kann mit der Anzahl an viralen Genomen der PBS-behandelten Tiere verglichen werden. Ob die mCMV_ΔIE2DTR infizierte Zelle tatsächlich durch die DT-Applikation in Apoptose geht, sollte durch mikroskopische Aufnahmen und einer FACS-Analyse geklärt werden. In humanen U937 Zellen wird eine lag-Phase von etwa 6h nach der ersten DT-Gabe beobachtet, bevor erste Zeichen der Apoptose, z.B. die DNA-Fragmentierung, sichtbar werden. Weitere 10h bis 15h werden benötigt, bis die Cytolyse der Zellen beobachtet werden kann (Chang *et al.*, 1989). Durch die in der vorliegenden Arbeit gezeigten mikroskopischen Aufnahmen von mCMV_ΔIE2DTR infizierten MEF nach DT-Behandlung, konnten erste Anzeichen einer Apoptose, die sich durch das Schrumpfen des Cytoplasmas und die Kontraktion der Plasmamembran bemerkbar machten, erstmals 25h bis 30h nach der Infektion und DT-Gabe beobachtet werden. Geht man davon aus, dass mCMV_ΔIE2DTR etwa 5h benötigt, um den DTR an der Zelloberfläche zu präsentieren, erfolgt die Apoptoseinduktion in dem gezeigten viralen System mit gleicher Kinetik im Vergleich zu humanen U937 Zellen. Zu früheren Zeitpunkten der DT-Inkubation, bis 25h nach der DT-Gabe, sind in den mikroskopischen Aufnahmen keinerlei Zellabkuglung, welche nach einer WT-Infektion normalerweise auftreten, zu beobachten. Das Virus kann durch die Hemmung der Proteinsynthese nicht mehr replizieren und keine Nachbarzellen infizieren, wodurch es zu keiner Plaquebildung kommt und die Zelle vor dem Virus geschützt zu sein scheint. Um die morphologischen Veränderungen der apoptotischen Zellen durch die DT-Behandlung auch physiologisch bestätigen zu können, wurden Zellen nach 45h DT-Inkubation im FACS analysiert. Während mCMV-WT.BAC infizierte Zellen mit und ohne DT-Behandlung, sowie mCMV_ΔIE2DTR infizierte Zellen ohne DT-Behandlung lediglich 3% bis 5% apoptotische Zellen aufwiesen, konnten in mCMV_ΔIE2DTR infizierten Zellen nach DT-Behandlung ungefähr 24% apoptotische Zellen detektiert werden. Obwohl nur $\frac{1}{4}$ der DT-

behandelten mCMV_ΔIE2DTR infizierten Zellen als apoptotisch erkannt wurden, lassen sich durch die FACS-Analysen die Ergebnisse der mikroskopischen Aufnahmen bestätigen. Demnach führt die DT-Behandlung ausschließlich in mCMV_ΔIE2DTR infizierten Zellen zur Apoptose, mCMV-WT.BAC infizierte Zellen können durch 100ng/ml DT nicht ausgelöscht werden. Für die Detektion der apoptotischen Zellen in der FACS-Analyse wurde ein Zeitpunkt gewählt, zu dem die Zellen in den mikroskopischen Aufnahmen eindeutige Merkmale der Apoptose aufwiesen. Das Zeitfenster, in dem die pathophysiologischen Veränderungen der apoptotischen Zellen durch die Färbung mit Annexin am besten markiert werden können, ist jedoch wahrscheinlich sehr viel größer. Werden die Zellen zu früh mit Annexin gefärbt, könnte es sein, dass die pathophysiologischen Veränderungen der Membran noch nicht in allen Zellen stattgefunden haben und folglich nicht alle Zellen im FACS erkannt wurden. Färbt man die Zellen zu spät, könnten bereits viele Zellen tot und lysiert sein, wodurch sie bei der FACS-Messung nicht mehr sichtbar sind. Die hier angegebenen Anteile an apoptotischen mCMV_ΔIE2DTR infizierten Zellen spiegeln somit nur einen Bruchteil der durch DT in Apoptose geführten Zellen wieder.

4.6 Wahl der optimalen Injektionsroute für DT bei akut infizierten Tieren

Bei der Applikation von Substanzen in Tiere ist die Route der Injektion sehr stark von der Viskosität, der Konzentration, der Sterilität und der Toxizität abhängig (Nebendahl, 2000). Allgemein kann man sagen, dass die i.v. Injektion am schnellsten die injizierten Stoffe im Körper verteilt, gefolgt von der i.p. und i.m. Injektion (Wolfensohn und Lloyd, 1994; Waynforth und Flecknell, 1992). Jede Injektionstechnik hat dennoch ihre Vor- und Nachteile, aufgrund dessen die Injektionstechniken für die jeweiligen Versuche abgestimmt werden sollten. Die am meisten verbreitete Injektionstechnik ist die i.p. Injektion, da sie einfach zu erlernen ist und eine Absorption der Stoffe über einen längeren Zeitraum ermöglicht. Die Absorptionsrate ist jedoch im Vergleich zu einer i.v. Injektion nur $\frac{1}{2}$ bis $\frac{1}{4}$ so schnell (Woodard, 1965). Weiterhin besteht die Gefahr, dass das Gewebe sensitiv auf reizende Stoffe reagiert und eine geringe Toleranz gegenüber Lösungen mit einem nicht physiologischen pH-Wert gegeben ist. Nicht limitierend ist dagegen das Injektionsvolumen. Bei einer i.p. Injektion können recht große Volumina verabreicht werden. Die i.v. Injektion ist im Gegensatz zur i.p. Injektion relativ unabhängig vom pH-Wert der Lösung und selbst reizende Substanzen oder hochkonzentrierte Lösungen können i.v. injiziert werden. Präparate, die vom Verdauungsapparat schwer absorbiert werden, können auch i.v. verabreicht werden. Ein großer Nachteil bei der i.v. Injektion besteht jedoch darin, dass bei mehrfacher Venenpunktion und Injektion von Substanzen die Venen beschädigt werden oder verstopfen (Nebendahl, 2000). Die am wenigsten verbreitete Technik bei der Maus ist die i.m. Injektion, da deren Muskeln sehr klein sind und maximal 50µl injiziert werden können. Ein weite-

rer sehr wichtiger Aspekt bei der richtigen Wahl der Injektionsroute ist die Frage, welches Organ man durch die Injektion einer Substanz erreichen will. Kulu und Kollegen (2009) untersuchten die Verteilung einer HSV-1 Mutante im Körper nach dreimaliger i.v. bzw. i.p. Virusapplikation. 48h nach der letzten Virusinfektion wurde die HSV-1-Verteilung in Lunge, Leber, Milz und Herz durch PCR bestimmt. Die i.p. Virusapplikation hatte eine wesentlich begrenztere systemische Verteilung im Körper zur Folge mit einer geringeren Frequenz der Virusdetektion in Niere, Lunge und Herz im Vergleich zu einer i.v. Applikation. Diese begrenzte i.p. Verteilung der Viren im Körper, im Vergleich zu einer i.v. Applikation, wurde begleitet durch eine geringere Toxizität und einer höheren LD_{50} von $> 1 \times 10^8$ PFU i.p. im Vergleich zu 1×10^7 PFU i.v.. Nicht nur die Dissemination von Viren, sondern auch die Aktivität von DT hängt von der Injektionsroute ab. Die Inhibierung der Proteinsynthese durch eine i.v. bzw. i.m. Injektion von DT wurde durch Bonventre und Saelinger bereits 1972 im Meerschweinchen untersucht. Dabei wurde der Einbau von 3H -Leucin bei der *de novo*-Synthese von Proteinen gemessen. Sie stellten fest, dass die Hemmung der Proteinsynthese nach i.m. Injektion von DT auf das Muskelgewebe, z.B. Herz und Skelettmuskulatur, begrenzt war und nicht-Muskelgewebe in Bezug auf die Proteinsynthese nicht verändert war. Eine i.v. DT-Gabe dagegen hatte auch in nicht-Muskelzellen eine wesentlich generalisiertere Inhibierung der Proteinsynthese zur Folge. Bezogen auf Muskelzellen verursachte eine i.v. DT-Injektion eine stärkere Hemmung der Proteinsynthese als eine i.m. Injektion der gleichen DT-Konzentration. Bemerkenswert war auch, dass Meerschweinchen keine Inhibierung der Proteinsynthese in der Lunge nach i.m. DT-Injektion aufwiesen. In unseren Versuchen bei akut infizierten Tieren wollen wir die Auswirkungen der DT-Behandlung in Leber, Milz, Pfole und v.a. der Lunge, im Hinblick auf die späteren Latenz-Versuche, untersuchen. Da, wie bei Bonventre und Saelinger (1972) gezeigt werden konnte, eine i.m. DT-Injektion die Proteinsynthese in der Lunge nicht hemmen konnte, wurde die i.m. Injektion direkt ausgeschlossen. Obwohl bei einer i.p. Injektion das DT zwar wesentlich begrenzter im Körper verteilt wird, war die i.p. Injektionstechnik die erste Wahl, da somit das DT zwar langsamer als i.v. im Körper verteilt wurde, dafür über einen längeren Zeitraum absorbiert werden konnte. Neben der i.p. Injektion wurde die i.v. Injektion zum Vergleich als Injektionsroute gewählt. Sowohl i.p., als auch i.v. wurden jeweils 50ng DT/g Maus einmalig an verschiedenen Tagen nach der Infektion verabreicht. Wie in den *in vitro*-Versuchen orientierten wir uns bei der Wahl der DT-Konzentration an Arbeitsgruppen, die bereits DT zur Auslöschung von Zellen in anderen Systemen verwendet haben. Saito und Kollegen (2001) verwendeten transgene Mäuse, die spezifisch das Gen für den humanen DTR unter der Kontrolle des Maus-Albumin *enhancer/promoters* exprimieren. Es wurden Hepatocyten als Target-Zelltyp verwendet, da Hepatocytenschäden *in vivo* durch die Messung der Aspartat Aminotransferase (AST) und Alanin Aminotransferase (ALT) Aktivität im Serum und histologisch in Leberschnitten leicht überwacht werden können. Eine i.m. Injektion von 5ng DT/g Maus verursachte ein schnelles Ansteigen des AST- und ALT-Levels im Serum 12h nach

der Injektion. In nicht transgenen Mäusen blieb zum einen die AST- und ALT-Aktivität auf dem normalen Level, selbst nach einer Injektion von 50ng DT/g Maus. Zum anderen wurde kein Hepatocyten-spezifischer Zelltod beobachtet. Da es sich bei dem von Saito und Kollegen (2001) verwendeten System um eine konstitutive Expression des humanen DTR handelt und der simian DTR dagegen in dieser Arbeit durch die Virusinfektion exprimiert wird, wählten wir sowohl für die i.p., als auch für die i.v. DT-Behandlung akut infizierter Tiere die höchste von Saito und Kollegen (2001) verwendete DT-Konzentration von 50ng/g Maus. Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Daten von akut mCMV_ΔIE2DTR infizierten Mäusen haben gezeigt, dass nach einer i.p. DT-Gabe von 50ng/g Maus ausschließlich an Tag 0 (6h nach der Infektion) die Zahl der viralen Genome in allen getesteten Organen reduziert werden konnte. Eine DT-Injektion zu späteren Zeitpunkten konnte keine detektierbare Reduktion der viralen DNA-Load verursachen. Eine einmalige i.v. DT-Gabe von 50ng/g Maus hatte dagegen bis Tag 3 als Injektionszeitpunkt eine Wirkung auf die DNA-Load in allen Organen, wobei bei der DT-Gabe 6h nach der i.v. Injektion der stärkste Effekt zu sehen war. Ein möglicher Grund dafür, dass eine i.p. DT-Gabe nur 6h nach der Infektion und später keine meßbare Reduktion der viralen DNA-Load verursachen konnte, ist, dass das DT zu spät zu den Zielorganen gelangt war und das DT bereits abgebaut war und von den Nieren aus dem Körper gespült wurde. Wie in Meerschweinchen gezeigt werden konnte (Masouredis, 1959), denen ^{131}I -DT i.v. injiziert wurde, wird DT exponentiell abgebaut. 67h nach DT-Applikation waren 87% des ^{131}I aus dem Körper ausgeschieden worden, gemessen durch den Abbau des ^{131}I . Dies bedeutet, dass DT lediglich eine Halbwertszeit von 19h aufweist. Wird das DT also erst 24h nach der Infektion verabreicht, hat das Virus bereits die zweite Replikationsrunde begonnen, bis das bereits zerfallene DT zu den Zielorganen gelangt. Es ist demnach schon zu viel Virus produziert worden, um eine Reduktion der viralen Genome messen zu können. Durch die i.v. DT-Gabe scheint dagegen sehr viel mehr aktives DT zu den Zielorganen zu gelangen. Wie bereits bei Kuhn und Kollegen (2009) beschrieben, verteilt die i.v. Injektionsroute Substanzen besser und nicht lokal begrenzt, im Vergleich zu einer i.p. Injektion. Für die folgenden Versuche an akut und latent infizierten Tieren haben die Ergebnisse der einmaligen i.p. bzw. i.v. DT-Applikation zur Folge, dass DT i.v. verabreicht werden muss, um eine schnelle und großflächige Verteilung des DT in den gewünschten Organen zu gewährleisten.

4.7 Wahl der optimalen DT-Konzentration und des optimalen Zeitpunkts der DT-Applikation in akut infizierten Tieren

Bei einer einmaligen i.v. DT-Applikation von 50ng/g Maus konnte die virale DNA-Load in den akut infizierten Tieren lediglich um eine log-Stufe reduziert werden. Da jedoch im Hinblick auf die späteren Latenz-Versuche alle latenten Genome ausgelöscht werden sollen, musste in den Vorarbeiten bei einer akut infizierten Maus die Versuchsbedingungen noch optimiert werden, um die

DNA-Load weiter reduzieren zu können. Dazu wurden zwei Versuche mit veränderten Versuchsbedingungen durchgeführt. Zum einen wurde die DT-Konzentration verändert, zum anderen wurde der Zeitpunkt der DT-Gabe variiert. Für die DT-Dosis-Wirk Kurve wurden Mäuse am Tag der Infektion (6h nach Infektion) mit unterschiedlichen Dosen an DT von 0,5ng/g Maus bis 500ng/g Maus behandelt. Niedrigere DT-Konzentrationen von 0,5ng/g Maus oder 5ng/g Maus konnten nach einer einmaligen i.v. DT-Applikation die virale DNA-Load nicht oder kaum reduzieren. Eine Erhöhung der DT-Konzentration von bisher 50ng/g Maus auf 500ng/g Maus führte zum Tod aller Tiere, selbst mCMV-WT.BAC infizierte Tiere starben bei dieser DT-Konzentration kurz nach der DT-Gabe. Eine aktuelle Arbeit von Klages (Klages *et al.*, 2010) bestätigt unsere Ergebnisse der DT-Dosis-abhängigen Depletion. Auch bei der Auslöschung von regulatorischen T-Zellen (T_{regs}) in transgenen DEREK-Mäusen war eine Dosis-abhängige Depletion der T_{regs} zu beobachten, mit einer vermehrten Depletion bei steigender DT-Konzentration. Durch die verstärkte Auslöschung der T_{regs} bei steigender DT-Konzentration konnte das Wachstum von Tumoren in den DEREK-Mäusen vermindert werden. Es konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass Tumor tragende Patienten eine gesteigerte Anzahl an T_{regs} aufweisen. Diese gelangen in den Tumor und unterdrücken eine effektive anti-Tumor Immunantwort. Klages und Kollegen (2010) beobachteten ebenfalls ein Wirkplateau zwischen 100ng DT und 1000ng DT, das in unserem Versuch, bei einem durchschnittlichen Körpergewicht von 20g bis 25g einer Maus, ungefähr einer DT-Konzentration von 50ng/g Maus entspricht. Die zuvor ausgewählte DT-Konzentration von 50ng/g Maus wurde zwar durch diese Versuche bestätigt, jedoch konnte die virale DNA-Load wiederum nicht mehr als eine log-Stufe reduziert werden. Die zweite Veränderung der Versuchsbedingungen erforderte die DT-Applikation zu veränderten Zeitpunkten. Wir wählten einen früheren Zeitpunkt (2h nach Infektion) statt wie zuvor 6h nach Infektion, und zwei spätere Zeitpunkte, 16h und 24h nach Infektion für die einmalige i.v. DT-Applikation von 50ng/g Maus. Sowohl die DT-Gabe zu einem früheren Zeitpunkt, als auch zu den späteren Zeitpunkten konnte die virale DNA-Load zwar reduzieren, jedoch stellte sich heraus, dass der Zeitpunkt 6h nach der Infektion die stärkste Reduktion nach einmaliger i.v. DT-Gabe verursachte. Bei der DT-Gabe 2h nach der Infektion konnte die virale DNA-Load nicht optimal reduziert werden, da 2h nach der Infektion zwar schon die IE-Gene exprimiert wurden, jedoch das DTR-Protein noch nicht an der Zelloberfläche präsentiert wurde, wenn man die Daten, welche aus Western Blot-Analysen stammen, zur zeitlichen Orientierung verwendet. Die Zellen waren somit zum Zeitpunkt der DT-Applikation noch nicht suszeptibel für das DT. Obwohl das DT eine Halbwertszeit von ungefähr 19h im Körper aufweist, verbleiben noch genügend aktive DT-Moleküle im Körper, um die infizierten Zellen auszulöschen, sobald der DTR präsentiert wird und die Zellen suszeptibel für das DT werden. 6h nach Infektion dagegen wurde der DTR bereits auf der Zelloberfläche präsentiert und das verabreichte DT konnte sofort jede Zelle auslöschen, die suszeptibel für das DT war. Bei der einmaligen DT-Applikation zu den späteren Zeitpunkten nach der akuten

Infektion waren bereits sehr viele Zellen infiziert, die nicht alle ausgelöscht werden konnten, da einige von ihnen zu diesem Zeitpunkt nicht suszeptibel für das DT waren. Die überlebenden Zellen konnten somit weiterhin neue Zellen infizieren. Der Zeitpunkt der DT-Applikation wurde auch bei Klages (Klages *et al.*, 2010) variiert. Die DT-Gabe erfolgte zu einem frühen, einem mittleren und einem späten Zeitpunkt nach der Tumorinokulation. Die DT-Gabe zu einem frühen Zeitpunkt ergab eine deutliche Reduktion des Tumorwachstums. Je später das DT verabreicht wurde, um so schlechter konnte das Tumorwachstum, also die Depletion der T_{regs} , erfolgen. Es ist demnach wichtig hervorzuheben, dass es nicht nur gilt, die optimale DT-Konzentration zu ermitteln, sondern auch den richtigen Zeitpunkt der DT-Gabe herauszufinden.

Sowohl die Veränderung der DT-Konzentration, als auch der veränderte Zeitpunkt der DT-Applikation konnten die virale DNA-Load in akut mCMV_ΔIE2DTR infizierten Tieren nicht mehr als eine log-Stufe reduzieren. Es schien demnach noch wichtiger zu sein, ein konstantes DT-Konzentrationslevel aufrecht zu erhalten, um jeweils neu infizierte Zellen wiederum sofort auslöschen zu können, sobald der DTR an deren Oberfläche präsentiert wird und die Zellen somit suszeptibel für das DT werden. Wie zuvor beschrieben, konnten Klages und Kollegen (2010) zwar mit einer einmaligen DT-Applikation die Zahl der T_{regs} reduzieren, eine weitere DT-Gabe reduzierte das Tumorwachstum jedoch noch stärker. Analog dazu wurden die hier akut infizierten Tiere ein zweites bzw. drittes mal mit 50ng/g Maus DT in einem Abstand von jeweils 16h behandelt. Dieses Zeitintervall entspricht in etwa der Halbwertszeit von DT *in vivo* mit 19h (Masouredis, 1959) und ermöglicht dadurch ein DT-Level beizubehalten, das nie unter 25ng/g Maus absinkt. Wie erwartet, konnte die DNA-Load durch die zweite DT-Gabe um eine weitere log-Stufe gesenkt werden. Die anschließende dritte DT-Gabe mit 50ng/g Maus war jedoch toxisch für die Tiere. Wie beim Menschen bekannt ist, sind Fehlfunktionen des Herzens gewöhnliche Folgen des DT (Burch *et al.*, 1968). Da in dem hier gezeigten Versuch nach dreimaliger DT-Behandlung selbst mCMV-WT.BAC infizierte Tiere starben, könnte es auch in der Maus zu Fehlfunktionen des Herzens kommen, wodurch die Tiere sterben. Ein Tier überlebte jedoch die dreimalige DT-Gabe, in dem eine Reduktion der viralen DNA-Load um eine weitere log-Stufe im Vergleich zur zweimaligen DT-Gabe erreicht werden konnte und die Zahl der infizierten Hepatocyten sogar unter das Detektionslimit gesenkt wurde. Dieser Befund machte deutlich, dass eine repetitive DT-Gabe essentiell ist, um die virale DNA-Load immer weiter reduzieren zu können. Um das Überleben der Tiere zu sichern, wurde die DT-Konzentration von 50ng/g Maus auf 10ng/g Maus herabgesetzt, jedoch nicht nur dreimal, sondern fünfmal in einem Abstand von jeweils 16h appliziert, um den DT-Wirkspiegel über einen noch längeren Zeitraum aufrecht erhalten zu können. Die repetitive DT-Behandlung mit 10ng/g Maus führte zu dem gleichen Erfolg wie eine dreimalige DT-Behandlung mit erhöhter DT-Konzentration, jedoch gleichzeitig zu einer wesentlich verbesserten Überlebensrate der Tiere. In einigen Tieren sanken sogar die Virustiter in Lunge und Speicheldrüse bzw. die Zahl der IE1-positiven Hepatocyten in

der Leber unter das Detektionslimit. Dass bei der Quantifizierung der viralen Genome trotzdem noch bis zu 5×10^5 Genome nachweisbar waren, ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass es in akut infizierten Tieren Zellen gibt, bei denen zum Zeitpunkt der DT-Applikation noch keine Genexpression stattgefunden hat oder es Genome gibt, die replikationsdefizient sind und somit der DTR nicht an der Oberfläche exprimiert werden konnte, wodurch die Zellen nicht suszeptibel für das DT wurden. Die Genome in der Zelle lassen sich jedoch auch in einem nicht replikativen Zustand quantifizieren, wodurch keine Unterscheidung zwischen replikativen und nicht replikativen Genomen getroffen werden kann. Für die folgenden Versuche an latent infizierten Tieren ergab sich aus den Ergebnissen der DNA-Load Reduktion in akut infizierten Tieren das folgende Protokoll: latent infizierte Tiere wurden ausgehend von der ersten DT-Gabe insgesamt fünfmal in einem Abstand von 16h mit einer DT-Konzentration von 10ng/g Maus i.v. behandelt.

4.8 Menge latenter mCMV-Genome in Lungenzellen

Berechnungen der Frequenzen latent infizierter LSEC von C. Seckert (Seckert *et al.*, 2009) haben gezeigt, dass sich eine latent infizierte Zelle in $1,89 \times 10^4$ (95%-Konfidenzintervall von $1,16 \times 10^4$ bis $3,08 \times 10^4$) LSEC befindet. In der vorliegenden Arbeit sollte die Zahl latent infizierter Zellen in der Lunge bestimmt werden. Aus den Berechnungen der Frequenzen konnte für die Lunge gezeigt werden, dass sich eine latent infizierte Zelle in 1.124 Lungenzellen befindet, mit einem 95%-Konfidenzintervall von 743 bis 1.702. Dieser Wert liegt dem ersten Anschein nach sehr weit entfernt von den Ergebnissen von Seckert *et al.* (2009) und denen anderer Arbeitsgruppen. Pollock und Kollegen (1997), sowie Slobedman und Mocarski (1999) beschrieben, dass sich in Zellen hämatopoietischen Ursprungs aus latent infizierten Mäusen eine latent infizierte Zelle pro 4×10^4 bis 5×10^4 PEC (*peritoneal exudate cells*) befindet. Die Frequenzen latent infizierter LSEC und PEC liegen demnach deutlich unter denen von Lungenzellen.

Berücksichtigt man jedoch die latente virale DNA-Load in der Lunge, kann man die Zahl viraler Genome in einer latent infizierten Zelle berechnen. Erstaunlicherweise ergab dies einen Wert von 9 Virusgenomen pro latent infizierter Zelle, mit einem 95%-Konfidenzintervall zwischen 6 und 13 Virusgenomen. Vergleicht man dies mit den Ergebnissen für LSEC, mit 11 (95%-Konfidenzintervall: 7 bis 19) viralen Genomen pro latent infizierter Zelle (Seckert *et al.*, 2009), sowie mit den Ergebnisse von Pollock (Pollock *et al.*, 1997) für PEC oder KMZ mit einer Kopienzahl von 1 bis 4 viralen Genomen bzw. 1 bis 10 viralen latenten Genomen für Makrophagen, sowie 2 bis 13 für KMZ, überlappen die Ergebnisse der Bestimmung viraler Genome in einer latent infizierten Zelle trotz der unterschiedlichen Frequenzen.

Wie in den Versuchen mit akut infizierten Mäusen gezeigt werden konnte, liegt die virale DNA-Load in der Lunge an Tag 10 nach der Infektion bei ungefähr 1×10^7 bis 1×10^8 viralen Genomen pro 1×10^6 Zellen. Dies würde bedeuten, dass sich 10 bis 100 virale Genome in einer Zelle befinden, falls jede Zelle infiziert wäre. Da aber, wie in der histologischen Färbung der Lunge gezeigt wurde, selbst während der akuten mCMV-Infektion nicht jede Zelle infiziert ist (Podlech *et al.*, 1998), muss die tatsächliche Zahl an viralen Genomen pro infizierter Lungenzelle einer akut infizierten Maus wesentlich höher sein. Das Ergebnis der *limiting dilution*-Titration, durch die eine geringe Anzahl an viralen Genomen pro Zelle errechnet wurde und die Tatsache, dass in den Organhomogenaten ausgewählter Lungenstücke keine infektiösen Viruspartikel nachgewiesen werden konnten, bestätigten die Definition der mCMV-Latenz.

4.9 Berechnung der Reaktivierungshäufigkeit latenter mCMV-Genome in der Lunge

Für die Berechnung der Reaktivierungshäufigkeit latenter mCMV-Genome galt es als Grundvoraussetzung, dass *DTR*-Transkripte während der Latenz nachweisbar sind. Nur durch die Präsentation des *DTR*-Proteins werden die latent infizierten Zellen suszeptibel für DT und können durch das Toxin ausgelöscht werden. In den zehn getesteten latent infizierten Tieren wurde aus je sechs Lungenstücken die RNA isoliert und die Anzahl der *IE1*- und *DTR*-Transkripte quantifiziert. Wie bei Simon *et al.* (2006a) beschrieben, finden sich für *IE1*-Transkripte sowohl positive, als auch negative Lungenstücke. Eine vergleichbare Transkriptverteilung ist auch in den in dieser Arbeit verwendeten Lungen latent infizierter Tiere zu beobachten. Mehr als die Hälfte aller Lungenstücke weisen keine *IE1*-Transkripte auf. Für die *DTR*-Transkripte ist dagegen eine erhöhte Transkriptaktivität zu beobachten. Von den getesteten Lungenstücken sind lediglich drei Lungenstücke negativ für *DTR*-Transkripte. Das Fehlen des *IE2*-Proteins könnte für die gesteigerte Transkriptionsaktivität eine Erklärung sein. Wie zuvor beschrieben kann nach der Insertion des *DTR*-Gens kein *IE2*-Protein mehr nachgewiesen werden. *IE2* ist zwar nicht essentiell für das Viruswachstum, könnte aber durchaus einen regulatorischen Effekt auf den *ie2*-Promotor haben. Für den essentiellen Transaktivator der E-Gene, *IE3*, konnte eine solche hemmende Wirkung auf den *ie1/3*-Promotor nachgewiesen werden (Messerle *et al.*, 1992). Fehlt also das *IE2*-Protein, kommt es eventuell nicht zu einer negativen *feedback*-Regulation des *ie2*-Promotors und die Transkription der *DTR*-Transkripte unter Kontrolle des *ie2*-Promotors wird fortgeführt. Jedoch ist zur Zeit für das *IE2*-Protein eine solche regulatorische Funktion nicht bekannt. Vielmehr besteht der Verdacht, dass die erhöhte Anzahl an Transkripten auf kontaminierende DNA zurückzuführen ist. Die *Primer* und Sonden zur Quantifizierung der *DTR*-Transkripte liegen ausschließlich im *DTR*-Gen, wodurch nicht unterschieden werden kann, ob RNA oder DNA amplifiziert wurde. Da auch ohne einen RT-Schritt Transkripte quantifiziert werden konnten, liegt die Zahl der tatsächlichen Transkripte unter der Anzahl der hier dargestellten *DTR*-Transkripte.

Die Tatsache, dass *DTR*-Transkripte sporadisch während der Latenz exprimiert werden, ermöglicht die MIE-Genexpression in ihrer Dynamik zu untersuchen. Während Versuche von Simon *et al.* (2006a) die *point prevalence*, d.h. den Anteil MIE-Gene exprimierender viraler Genome zu einem bestimmten Moment, auf 10 bis 20 Ereignisse von MIE-Lokus Aktivität pro 1×10^6 latenten viralen Genomen beschrieben, sollte diese Arbeit klären, wie viele spontane transkriptionelle Ereignisse tatsächlich in einem bestimmten Zeitraum auftreten. Daten von Holtappels *et al.* (2000) haben gezeigt, dass sich IE1-spezifische CD8 T-Zellen während der Latenz anhäufen. Dazu wird jedoch ein Stimulus benötigt, der wesentlich häufiger präsent sein muss (*period prevalence*). Um unsere Hypothese zu bestätigen, wurden Mäuse mit mCMV-IE1L176A_ΔIE2DTR latent infiziert und 10 Monate nach der Infektion repetitiv mit DT behandelt. Weisen die latent infizierten Zellen eine spontane MIE-Genexpression auf, wird der DTR unter Kontrolle des *ie2*-Promotors, der während der Latenz sporadisch aktiv ist, exprimiert und die Zelle stirbt einen apoptotischen Tod. Dies führt durch die Zerstörung der Zelle zur Abnahme an latenten viralen Genomen. Da die Reduktion der viralen latenten DNA-Load ausschließlich auf die Wirkung des DT zurückzuführen ist und das DT zur Gebrauchslösung in PBS verdünnt wurde, verglichen wir die DNA-Load der DT-behandelten Tiere mit der DNA-Load der PBS-behandelten Tiere. Die DNA-Load konnte im ersten Versuch durch eine i.v. DT-Gabe von einmal 20ng/g Maus bzw. viermal 10ng/g Maus um 36% gesenkt werden. Die Auslöschung von nicht einmal der Hälfte der latenten Genome war nicht zufriedenstellend. Aufgrund dessen wurde die Anzahl der DT-Applikationen auf acht Injektionen erhöht. Wie anfangs erwähnt, kann es durch mehrfache i.v. Injektionen zur Zerstörung oder zum Verschluss der Venen kommen. Die Tiere wurden deshalb einmal mit 20ng/g Maus, dreimal mit 10ng DT/g Maus i.v. und anschließend viermal mit 30ng DT/g Maus i.p. behandelt. Eine Erhöhung der DT-Konzentration von 10ng/g Maus i.v. auf 30ng/g Maus stellte sich durch die Arbeiten von Marion Grießl (unveröffentlichte Daten) als nicht toxisch für die Tiere dar. Durch die erhöhte DT-Konzentration sollte somit sichergestellt werden, dass trotz der längeren Absorptionszeiten nach der letzten i.p. Injektion noch genügend aktives DT in die Lunge gelangt. In diesem Versuch mit einer achtmaligen DT-Gabe konnte daraufhin die virale latente DNA-Load um 61% gesenkt werden. Da bei der Berechnung der viralen DNA-Load der beiden Versuche auf ein zelluläres Gen normiert wurde, bestand die Gefahr, dass die Reduktion der DNA-Load durch infiltrierende Zellen verursacht wurde und nicht durch die Wirkung des DT. Infiltrierende Zellen könnten die Zahl der zellulären Gene erhöhen und somit den Anteil an viralen Genomen verringern. Das würde zu einer vermeintlichen Reduktion der viralen DNA-Load führen. Da sowohl keine Erhöhung der DNA-Mengen der verwendeten Eluate der Lungenstücke aus dem zweiten Latenz-Versuch gemessen wurde, als auch die Anzahl der zellulären Gene in beiden Gruppen gleich waren, ist davon auszugehen, dass keine zusätzlichen Zellen in die Lunge infiltriert haben und die Reduktion der DNA-Load der DT-behandelten Tiere ausschließlich auf die DT-Applikation zurückzuführen ist.

Wenn wir davon ausgehen, dass die Wahrscheinlichkeit einer Latenz-assoziierten MIE-Lokus Aktivität umso geringer ist, je weniger latent infizierte Zellen vorhanden sind, folgt die Abnahme der viralen latenten Genome einer fallenden Exponentialfunktion. Für beide Latenz-Versuche lässt sich somit die Zerfallsrate bzw. die prozentuale Abnahme der Genome pro Stunde mit 0,505% für den ersten Versuch und 0,515% für den zweiten Versuch berechnen. Dieses Ergebnis bestätigt unsere Annahme, dass mit zunehmender DT-Behandlung mehr Zellen ausgelöscht werden. Im ersten Experiment wurden zwar 36% der Genome ausgelöscht, jedoch war die Zeitspanne zu kurz, um alle Zellen auszulöschen. Durch die längere DT-Exposition und die längere Wartezeit bis zur Organentnahme im zweiten Latenz-Versuch, konnten die in dieser Zeit neu transkriptionell aktiven Zellen ausgelöscht und die DNA-Load weiter abgesenkt werden. In einem Zeitraum von 184h wurden durch DT 61% der latenten viralen Genome ausgelöscht, das bedeutet eine Reduktion von 480.429 latenten Genomen auf 192.172 latenten Genomen in der gesamten Lunge. Somit wurden durchschnittlich etwa 1.000 bis 2.500 latente virale Genome pro Stunde in dem getesteten Zeitraum ausgelöscht; folglich zeigten, wenn man von 9 viralen Genomen pro latent infizierter Zelle ausgeht, wie durch die *limiting dilution*-Titration berechnet, pro Stunde 110 bis 280 latent infizierte Zellen eine spontane MIE-Lokus Aktivität.

Vergleicht man nun die *point prevalence* von 10 bis 20 exprimierenden Genomen pro 1×10^6 latenten Genomen mit der *period prevalence* von 1.000 bis 2.500 exprimierenden Genomen pro ca. 500.000 latenten Genomen pro Stunde, zeigt sich eine ungefähr 200-fach höhere MIE-Lokus Aktivität als durch die Berechnung der *point prevalence* zu erwarten wäre. Dieses Ergebnis bestätigt hiermit unsere eingangs aufgestellte Hypothese, dass stetig eine Latenz-assoziierte Transkription stattfinden muss, damit IE1-spezifische CD8 T-Zellen angereichert werden können. Ausgehend von der Annahme der Auslöschung vergleichbar einer fallenden Exponentialfunktion, müsste die DT-Behandlung für 443h andauern um weniger als 50.000 latente Genome nachweisen zu können, was einer Reduktion von 90% entspricht. Um eine 98%-ige Auslöschung, also weniger als 10.000 Genome, zu erreichen, müsste DT für ungefähr 750h verabreicht werden. Die benötigte Zeitspanne der DT-Exposition wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\log\left(\frac{c(t_2)}{c(t_1)}\right)}{\log\left(1 - \frac{p\%}{100}\right)} + t_1 = t$$

t_1 , Zeitpunkt vor der DT-Behandlung ($t=0$); t , Dauer der benötigten DT-Behandlung bis zur Organentnahmen [h]; $c(t_1)$, virale DNA-Load der PBS-Gruppe; $c(t_2)$, gewünschte virale DNA-Load der DT-Gruppe; $p(\%)$, Auslöschungsrate

Da es sich bei dem für die Latenz-Versuche verwendeten Virus um die mCMV-IE1L176A_ΔIE2DTR Mutante handelt, muss bei der Berechnung und Interpretation der *period prevalence* folgendes beachtet werden. Bei mCMV-WT.BAC erfolgt sowohl in der akuten Phase der Infektion, als auch während der Latenz nach der *ie1*-Genexpression die Präsentation des IE1-Peptids über den MHC Klasse I-Komplex (H-2K^d) auf der Zelloberfläche. Die Erkennung des IE1-Peptids durch IE1-spezifische CD8 T-Zellen terminiert schließlich die Virusreaktivierung. Bei der verwendeten Mutante mCMV-IE1L176A_ΔIE2DTR dagegen ist das antigene Peptid durch die Punktmutation von Leu nach Ala in der C-terminalen Anker-AS des MHC Klasse I funktionell deletiert (Simon *et al.* 2006a). Zellen, die mit diesem Virus infiziert sind, werden nicht von IE1-spezifischen CD8 T-Zellen erkannt. Dies führt zu einem signifikanten Anstieg der *point prevalence* von *IE1*-Transkripten in Lungen latent infizierter Tiere (Simon *et al.*, 2006a). Während in Tieren, infiziert mit mCMV-WT.BAC bzw. der authentischen Revertante, in 14 von 80 Lungenstücken *IE1*-Transkripte nachgewiesen werden konnten, waren bei der Mutante 51 von 80 Lungenstücken positiv für *IE1*-Transkripte. Das bedeutet, dass die Verhinderung der konkurrierenden Immunkontrolle durch IE1-spezifische CD8 T-Zellen zu einer fünf- bis sechsfachen Steigerung an detektierbaren transkriptionellen Ereignissen in Lungen latent infizierter Tiere führte (Simon *et al.*, 2006a). Die latente virale DNA-Load liegt dennoch mit 1×10^4 latenten viralen Genomen pro 1×10^6 Zellen im Bereich von mCMV-WT.BAC. Das bedeutet nun, dass die berechnete *period prevalence* der Mutante mCMV-IE1L176A_ΔIE2DTR etwas höher sein muss, als es für die Mutante mCMV_ΔIE2DTR bzw. für mCMV-WT.BAC der Fall sein dürfte. Da jedoch nicht definitiv vorausgesagt werden konnte, ob überhaupt ein Unterschied zwischen DT- und PBS-behandelten Tieren zu sehen sein wird und die Depletion von Virus infizierten Zellen während der Latenz funktioniert, wurde das Virus mCMV-IE1L176A_ΔIE2DTR verwendet, das eine höhere Rate an Latenz-assoziiierter MIE-Transkription aufweist.

4.10 Eine Reduktion der viralen DNA-Load durch DT verringert das Risiko der Virusreaktivierung

Die Rekurrenz von CMV aus der Latenz ist oft die Ursache für Erkrankungen in immunsupprimierten Patienten. Dabei spielt die Lunge als ein Hauptort der CMV-Latenz eine wesentliche Rolle (Balthesen *et al.*, 1993). Es ist bekannt, dass die Kopienzahl latenter viraler DNA mit der Inzidenz einer *in vivo*-Rekurrenz korreliert. Reddehase und Kollegen (1994) verglichen das Risiko einer mCMV-Rekurrenz latenter Mäuse, welche direkt nach der Geburt mit mCMV infiziert wurden, mit Mäusen, die erst im Erwachsenenalter infiziert wurden und Latenz etablierten. Sie beobachteten, dass das Risiko der mCMV-Rekurrenz in den neonatal infizierten Tieren stark erhöht war. Während in adult infizierten Tieren kaum Virusrekurrenz detektiert werden konnte, mit Ausnahme der Lunge, bei der in zwei von 30 Individuen infektiöses Virus nach induzierter

Rekurrenz nachgewiesen werden konnte, wurde in neonatal infizierten Mäusen eine signifikant höhere Rekurrenz beobachtet. Zurückzuführen war dieser Befund auf die wesentlich höhere latente DNA-Load, die sich in neonatal infizierten Mäusen etablieren konnte. Somit korreliert die Menge latenter viraler DNA mit dem Risiko der Rekurrenz nicht nur bei α - und γ -Herpesviren wie HSV-1 und HSV-2 bzw. EBV (zur Übersicht: Roizman und Sears, 1987), sondern auch bei β -Herpesviren.

Um den Einfluss der in dieser Arbeit gezeigten Reduktion der latenten viralen DNA-Load nach DT-Behandlung auf das Risiko einer mCMV-Rekurrenz zu ermitteln, wurden die Lungenstücke DT-behandelter Tiere über einen Zeitraum von 10 Wochen in Medium kultiviert und wöchentlich die Anzahl reaktivierender Lungenexplantate protokolliert. Um eine persistente Infektion bzw. eine spontane Rekurrenz auszuschließen, wurden drei Lungenstücke pro Tier mittels PFU-Assay auf die Anwesenheit von infektiösem Virus getestet. In keinem der getesteten Lungenstücke latent infizierter Tiere konnte infektiöses Virus nachgewiesen werden. Bemerkenswert war, dass sowohl in DT-behandelten (2 aus 112), als auch in DT-unbehandelten Tieren (6 aus 112) bereits nach einer Woche einzelne Kulturen positiv waren. Die Zahl der positiven Kulturen stieg jedoch bei den unbehandelten Tieren im Verlauf der Kultivierung deutlich schneller an. Nach 4 Wochen Kultivierung waren über 50% der Kulturen bei DT-unbehandelten Tieren positiv (68 aus 112), bei den DT-behandelten Tieren wurde dieser Schwellenwert erst 2 Wochen später erreicht. Zum Ende des Versuchs, nach 10 Wochen Kultivierung, waren 78% der DT-unbehandelten Kulturen positiv im Vergleich zu 68% der DT-behandelten Tiere. Wie erwartet zeigten also DT-unbehandelte Tiere eine häufigere Reaktivierung aus den Lungenexplantatkulturen im Vergleich zu DT-behandelten Tieren. Die Reduktion der viralen latenten DNA-Load durch die DT-Behandlung von 8.097 Genomen pro 1×10^6 Zellen auf 3.133 Genomen/ 1×10^6 Zellen im zweiten Latenz-Versuch, also eine Auslöschung von 61% der latenten viralen Genome, hatte demnach einen direkten Einfluss auf die Reaktivierungshäufigkeit.

4.11 Fazit und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal ein Virus hergestellt, mit dem man konditional und selektiv mCMV *in vitro* und *in vivo* auslöschen kann. Dazu wurde mit Hilfe der Zwei-Schritt BAC-Mutagenese ein BAC-Plasmid hergestellt, das ein Gen für den simian DTR unter Kontrolle des *ie2*-Promotors enthält, wodurch alle Zellen mit DT ausgelöscht werden, deren MIE-Lokus transkriptionell aktiv ist. Die Etablierung dieser neuen Methode war nicht nur für die in dieser Arbeit behandelten Fragestellungen, sondern auch für weiter folgende Aufgaben von essentieller Bedeutung. Vornehmlich konnte durch die neu etablierte Methode die eingangs aufgestellte Hypothese, dass während der Latenz deutlich mehr transkriptionelle Ereignisse auftreten müssen als bisher vermutet, bestätigt werden. Zum ersten Mal konnte quantitativ ermittelt werden, wie

viele Reaktivierungsereignisse tatsächlich in einem bestimmten Zeitraum auftreten (*period prevalence*). Eine wichtige Frage, die es noch zu klären gilt, ist, ob die mCMV-Latenz durch weitere DT-Behandlungen völlig ausgelöscht werden kann. Dazu muss jedoch die DT-Konzentration über einen sehr langen Zeitraum von mehr als 184h auf einem relativ hohen Level gehalten werden, was zum einen technisch sehr schwierig ist und zum anderen das Risiko einer erhöhten Mortalitätsrate birgt. Da für die Latenz-Versuche die Mutante mCMV-IE1L176A_ΔIE2DTR verwendet wurde, wird untersucht werden müssen, ob auch die DNA-Load in mCMV_ΔIE2DTR durch die gleichen Versuchsbedingungen reduziert werden kann und die Berechnung der *period prevalence* erfolgen kann, was sich als ungleich schwieriger darstellen wird. Des Weiteren konnte in dieser Arbeit erstmals die Anzahl an latenten viralen Genome in einer latent infizierten Lungenzelle ermittelt werden. Die Zahl der viralen Genome in einer Zelle stimmt sehr gut mit den vorangegangenen Versuchen von Christof Seckert überein, der sowohl den latent infizierten Zelltyp in der Leber identifizieren konnte, als auch die Zahl der latenten viralen Genome in den LSEC berechnete. Da wir durch seine Arbeiten wissen, welcher Zelltyp in der Leber der Ort der CMV-Latenz ist, sollte weiterführend auch für die Lunge geklärt werden, in welchen Zellen Latenz etabliert wird.

Aus der konditionalen Depletion des rekombinanten DTR-Virus ergeben sich noch weitere Fragen, die durch diese Methode bearbeitet werden können. Durch die Insertion des *DTR*-Gens ist kein IE2-Protein mehr vorhanden. Es wäre also möglich, regulatorische Eigenschaften des IE2-Proteins zu untersuchen, da zwar das Protein fehlt, die Wachstumseigenschaften des Virus jedoch nicht beeinträchtigt sind. Weiterhin könnte das rekombinante Virus zur Untersuchung der *memory inflation* dienen. Während der mCMV-Latenz akkumulieren einige mCMV-spezifische CD8 T-Zell *memory*-Populationen. Durch die stetige *low level*-Reaktivierung aus der Latenz werden Antigene, die früh im viralen Replikationszyklus exprimiert werden (z.B. IE1) präsentiert und führen zur Aktivierung und Proliferation von Antigen-spezifischen CD8 T-Zellen. Eine Auslöschung der transkriptionell aktiven Zellen durch DT würde den antigenen Stimulus verringern und man könnte die Auswirkungen eines niedrigen Antigen-Levels auf die Induktion und Erhaltung der CD8 T-Zell *memory*-Antwort untersuchen.

Literaturverzeichnis

- Abraham, J. A., D. Damm, A. Bajardi, J. Miller, M. Klagsbrun, and R. A. B. Ezekowitz.** 1993. Heparin-binding EGF-like Growth Factor: characterization of rat and mouse cDNA clones, protein domain conservation across species, and transcript expression in tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **190(1)**: 125-133.
- Adler, H., M. Messerle, and U. H. Koszinowski.** 2001. Virus reconstituted from infectious bacterial artificial chromosome (BAC)-cloned murine gammaherpesvirus 68 acquires wildtype properties in vivo only after excision of BAC vector sequences. *J. Virol.* **75**: 5692-5696.
- Adler, B., C. Sinzger.** 2009. Endothelial cells in human cytomegalovirus infection: one host cell out of many or a crucial target for virus spread? *Thromb. Haemost.* **102(6)**: 1057-1063.
- Andrews, D. M., C. E. Andoniou, F. Granucci, P. Ricciardi-Castagnoli, and M. A. Degli-Esposti.** 2001. Infection of dendritic cells by murine cytomegalovirus induces functional paralysis. *Nature Immunol.* **2**: 1077-1084.
- Angulo, A., P. Ghazal, and M. Messerle.** 2000. The major immediate-early gene ie3 of mouse cytomegalovirus is essential for viral growth. *J. Virol.* **74**: 11129-11136.
- Angulo, A, D. Kerry, H. Huang, E. M. Borst, A. Razinsky, J. Wu, U. Hobom, M. Messerle, and P. Ghazal.** 2000. Identification of a boundary domain adjacent to the potent human cytomegalovirus enhancer that represses transcription of the divergent UL127 promoter. *J. Virol.* **74(6)**: 2826-2839.
- Arase, H., E. S. Mocarski, A. E. Campbell, A. B. Hill, and L. L. Lanier.** 2002. Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science* **296**: 1323-1326.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman.** 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.

- Bain, M., M. Reeves, and J. Sinclair.** 2006. Regulation of human cytomegalovirus gene expression by chromatin remodelling, p. 167-183. In M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Balthesen, M., L. Dreher, P. Lucin, M. J. Reddehase** 1994. The establishment of cytomegalovirus latency in organs is not linked to local virus production during primary infection. *J Gen Virol.* **75**: 2329-2336.
- Balthesen, M., M. Messerle, and M. J. Reddehase.** 1993. Lungs are a major organ site of cytomegalovirus latency and recurrence. *J. Virol.* **67**: 5360-5366.
- Bennett, M. J., and D. Eisenberg.** 1994. Refined structure of monomeric diphtheria toxin at 2.3 Å resolution. *Protein Sci.* **3**: 1464-1475.
- Bentz, G. L., M. Jarquin-Pardo, G. Chan, M. S. Smith, C. Sinzger, and A. D. Yurochko.** 2006. Human cytomegalovirus (HCMV) infection of endothelial cells promotes naive monocyte extravasation and transfer of productive virus to enhance hematogenous dissemination of HCMV. *J. Virol.* **80(23)**: 11539-11555.
- Bernstein, B. E., E. L. Humphrey, R. L. Erlich, R. Schneider, P. Bouman, J. S. Liu, T. Kouzarides, and S. L. Schreiber.** 2002. Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99(13)**: 8695-8700.
- Bevan, I. S., C. C. Sammons, and C. Sweet.** 1996. Investigation of murine cytomegalovirus latency and reactivation in mice using viral mutants and the polymerase chain reaction. *J. Med. Virol.* **48**: 308-320.
- Birnboim, H. C., und J. Doly.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* **7**: Nr.6.
- Birnboim, H. C..** 1983. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* **100**: 243-255.
- Bissinger, A. L., H. Oettle, G. Jahn, P. Neuhaus, and C. Sinzger.** 2004. Cytomegalovirus infection after orthotopic liver transplantation is restricted by a pre-existing antiviral immune response of the recipient. *J. Med. Virol.* **73**: 45-53.
- Bissinger, A. L., C. Sinzger, E. Kaiserling, and G. Jahn.** 2002. Human cytomegalovirus as a direct pathogen: correlation of multiorgan involvement and cell distribution with clinical and pathological findings in a case of congenital inclusion disease. *J. Med. Virol.* **67**: 200-206.

- Blomfield, I. C., V. Vaughn, R. F. Rest, and B. I. Eisenstein.** 1991. Allelic exchange in *Escherichia coli* using *Bacillus subtilis* *sacB* gene and temperature-sensitive pSC101 replicon. *Mol. Microbiol.* **5**: 1447-1457.
- Boeckh, M., and R. Bowden.** 1995. Cytomegalovirus infection in marrow transplantation, p. 97-136. In C. D. Bruckner (ed.), *Technical and biological components of marrow transplantation*. Boston: Kluwer Academic.
- Böhm, V., C. K. Seckert, C. O. Simon, D. Thomas, A. Renzaho, D. Gendig, R. Holtappels, and M. J. Reddehase.** 2009. Immune evasion proteins enhance cytomegalovirus latency in the lungs. *J. Virol.* **83(19)**: 10293-10298.
- Boehme, K. W., and T. Compton.** 2006. Virus entry and activation of innate immunity. p.63-89. In M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Bolovan-Fritts, C. A., E. S. Mocarski, and J. A. Wiedeman.** 1999. Peripheral blood CD14+ cells from healthy subjects carry a circular conformation of latent cytomegalovirus genome. *Blood* **93**: 394-398.
- Bonventre, P. F., and C. B. Saelinger.** 1972. Inhibition of protein synthesis after intravenous or intramuscular challenge with diphtheria toxin. *Infect Immun.* **6(3)**: 418-421.
- Borst, E. M., I. Crnkovic-Mertens, and M. Messerle.** 2004. Cloning of beta-herpesvirus genomes as bacterial artificial chromosomes. *Methods Mol. Bio.* **256**: 221-239.
- Borst, E. M., G. Hahn, U. H. Koszinowski, and M. Messerle.** 1999. Cloning of the human cytomegalovirus (HCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*: a new approach for construction of HCMV mutants. *J. Virol.* **73**: 8320- 8329.
- Boyle, K. A., and T. Compton.** 1998. Receptor-binding properties of a soluble form of human cytomegalovirus glycoprotein B. *J. Virol.* **72**: 1826-1833.
- Britt, W..** 2006. Human cytomegalovirus infections and mechanisms of disease, p. 1-28. In M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Britt, W..** 2008. Manifestations of human cytomegalovirus infection: proposed mechanisms of acute and chronic disease. Review. *Curr Top Microbiol Immunol.* **325**: 417-470.

- Bruning, J. H., C. A. Bruggeman, C. P. van Boven, and P. J. van Breda Vriesman.** 1986. Passive transfer of cytomegalovirus by cardiac and renal organ transplants in a rat model. *Transplantation* **41**: 695-698.
- Buch, T., F. L. Heppner, C. Tertilt, T. J. Heinen, M. Kremer, F. T. Wunderlich, S. Jung, and A. Waisman.** 2005. A Cre-inducible diphtheria toxin receptor mediates cell lineage ablation after toxin administration. *Nat Methods*. **6**: 419-426.
- Bukowski, J. F., B. A. Woda, and R. M. Welsh.** 1984. Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection in natural killer cell-depleted mice. *J. Virol.* **52**: 119-128.
- Burch, G. E., S. C. Sun, R. S. Sohal, K. C. Chu, and H. L. Colcolough.** 1968. Diphtheritic myocarditis. A histochemical and electron microscopic study. *Am J Cardiol.* **21(2)**: 261-268.
- Cardin, R. D., G. B. Abenes, C. A. Stoddart, and E. S. Mocarski.** 1995. Murine cytomegalovirus IE2, an Activator of Gene Expression, is dispensable for Growth and Latency in mice. *Virology.* **209**: 236-241.
- Cha, J.-H., J. S. Brooke, and L. Eidels.** 1998. Toxin Binding site of the diphtheria toxin receptor: loss and gain of diphtheria toxin binding of monkey and mouse heparin-binding, epidermal growth factor-like growth factor precursor by reciprocal site-directed mutagenesis. *Molecular Microbiology* **29(5)**: 1275-1284.
- Chang, M. P., J. Bramhall, S. Graves, B. Bonavida, and B. J. Wisnieski.** 1989. Internucleosomal DNA Cleavage Precedes Diphtheria Toxin-induced Cytolysis. *J Biol Chem.* **264**: 15261-15267.
- Chang, Y., E. Cesarman, M. S. Pessin, F. Lee, J. Culpepper, D. M. Knowles, and P. S. Moore.** 1994. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* **266**: 1865-1869.
- Chen, D. H., H. Jiang, M. Lee, F. Liu, and Z. H. Zhou.** 1999. Three-dimensional visualization of tegument/capsid interactions in the intact human cytomegalovirus. *Virology* **260**: 10-16.
- Chee, M. S., A. T. Bankier, S. Beck, R. Bohni, C. M. Brown, R. Cerny, T. Horsnell, C. A. Hutchison III, T. Kouzarides, J. A. Martignetti, E. Preddie, S. C. Satchwell, P. Tomlinson, K. M. Westom, and B. G. Barrell.** 1990. Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **154**: 125-169.

- Chong, K. T., and C. A. Mims.** 1981. Murine cytomegalovirus particle types in relation to sources of virus and pathogenicity. *J. Gen. Virol.* **57**: 415-419.
- Chung D. W., and R. J. Collier.** 1977. The mechanism of ADP-ribosylation of elongation factor 2 catalyzed by fragment A from diphtheria toxin. *Biochim Biophys Acta.* **483(2)**: 248-57.
- Collier, R. J..** 1975. Diphtheria Toxin: Mode of action and structure. *Bacteriological Reviews* **39**: 54-85.
- Collier, R. J..** 2001. Understanding the mode of action of diphtheria toxin: a perspective on progress during the 20th century. *Toxicon.* **39**: 1793-1803.
- Compton, T., R. R. Nepomuceno, and D. M. Nowlin.** 1992. Human cytomegalovirus penetrates host cells by pH -independent fusion at the cell surface. *Virology* **191**: 387-395.
- Compton, T., D. M. Nowlin, and N. R. Cooper.** 1993. Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology* **193**: 834-841.
- Dalod, M., T. Hamilton, R. Salomon, T. P. Salazar-Mather, S. C. Henry, J. D. Hamilton, and C. A. Biron.** 2003. Dendritic cell responses to early murine cytomegalovirus infection: subset functional specialization and differential regulation by interferon α/β . *J. Exp. Med.* **197**: 885-898.
- Davis-Fleischer, K. M., and G. E. Besner.** 1998. Structure and Function of Heparin-Binding EGF-like Growth Factor (HB-EGF). *Frontiers in Bioscience* **3**: 288-299.
- Dolan, A..** 2004. Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* **85**: 1301-1312.
- Dorsch-Häsler, K., G. M. Keil, F. Weber, M. Jasin, W. Schaffner, and U. H. Koszowski.** 1985. A long and complex enhancer activates transcription of the gene coding for the highly abundant immediate early mRNA in murine cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **82**: 8325-8329.
- Dowling J. N., A. R. Saslow, J. A. Armstrong, and M. Ho.** 1976. Cytomegalovirus infection in patients receiving immunosuppressive therapy for rheumatologic disorders. *J. Infect. Dis.* **133**: 399-408.
- Dumas, A., J. Geelen, W. Maris, and J. van der Noordaa.** 1980. Infectivity and molecular weight of varicella-zoster virus DNA. *J. Gen. Virol.* **47**: 233-235.

- Dunn, W., C. Chou, H. Li, R. Hai, D. Patterson, V. Stolc, H. Zhu, and F. Liu.** 2003. Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 14223-14228.
- Eickbush, T. H., and E. N. Moudrianakis.** 1978. The compaction of DNA-helices into either continuous supercoils or folded fiber rods and toroids. *Cell* **13**: 295-306.
- Eickmann, M., D. Gicklhorn, and K. Radsak.** 2006. Glycoprotein trafficking in virion morphogenesis, p. 245-264. In M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Eidels, L., R. L. Proia, and D. A. Hart.** 1983. Membrane Receptors for Bacterial Toxins. *Microbiol. Rev.* **47**: 596-620.
- Epstein, M. A., G. Henle, B. G. Achong, Y. M. Barr.** 1965. Morphological and biological studies on a virus in cultured lymphoblasts from burkitt's lymphoma. *J. Exp. Med.* **121**: 761-770.
- Fadok, V. A., D. R. Voelker, P. A. Campbell, J. J. Cohen, D. L. Bratton, and P. M. Henson.** 1992. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol.* **148(7)**: 2207-2216.
- Feire, A. L., H. Koss, and T. Compton.** 2004. Cellular integrins function as entry receptors for human cytomegalovirus via a highly conserved disintegrin-like domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 15470-15475.
- Fitzgerald, N. A., J. M. Papadimitriou, and G. R. Shellam.** 1990. Cytomegalovirus-induced pneumonitis and myocarditis in newborn mice. A model for perinatal human cytomegalovirus infection. *Arch. Virol.* **115**: 75-88.
- Frenkel, N., E. C. Schirmer, L. S. Wyatt, G. Katsafanas, E. Roffman, R. M. Danovich, and C. H. June.** 1990. Isolation of a new herpesvirus from human CD4+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 748-752.
- Gassen, H. G., und G. Schrimpf.** 1999. *Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin.
- Ghazal, P., M. Messerle, K. Osborn, and A. Angulo.** 2003. An essential role of the enhancer for murine cytomegalovirus in vivo growth and pathogenesis. *J. Virol.* **77**: 3217-3228.

Ghazal, P., A. E. Visser, M. Gustems, R. García, E. M. Borst, K. Sullivan, M. Messerle, and A. Angulo. 2005. Elimination of *ie1* significantly attenuates murine cytomegalovirus virulence but does not alter replicative capacity in cell culture. *J. Virol.* **79**: 7182-7194.

Giugni, T. D., C. Soderberg, D. J. Ham, R. M. Bautista, K. O. Hedlund, E. Moller, and J. A. Zaia. 1996. Neutralization of human cytomegalovirus by human CD13-specific antibodies. *J. Infect. Dis.* **173**: 1062-1071.

Gluzman, Y. 1981. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23**: 175-182.

Goishi K., S. Higashiyama, M. Klagsbrun, N. Nakano, T. Umata, M. Ishikawa, E. Mekada, and N. Taniguchi. 1995. Phorbol Ester Induces the Rapid Processing of Cell Surface Heparin-binding EGF-like Growth Factor: Conversion from Juxtacrine to Paracrine Growth Factor Activity. *J. Virol.* **75**: 2692-2705.

Grefte, A., N. Blom, M. van der Giessen, W. van Son, and T. H. The. 1993a. Ultrastructural analysis of circulating cytomegalic cells in patients with active cytomegalovirus infection: evidence for virus production and endothelial origin. *J. Infect. Dis.* **168**: 1110-1118.

Grefte, A., M. C. Harmsen, M. van der Giessen, S. Knollema, W. J. van Son, and T. H. The. 1994. Presence of human cytomegalovirus (HCMV) immediate-early mRNA but not ppUL83 (lower matrix protein pp65) mRNA in polymorphnuclear and mononuclear leukocytes during active HCMV infection. *J. Gen. Virol.* **75**: 1989-1998.

Grefte, A., M. van der Giessen, W. van Son, and T. H. The. 1993b. Circulating cytomegalovirus (CMV) infected endothelial cells in patients with an active CMV infection. *J. Infect. Dis.* **167**: 270-277.

Gribaudo, G., L. Riera, D. Lembo, M. De Andrea, M. Gariglio, T. L. Rudge, L. F. Johnson, and S. Landolfo. 2000. Murine cytomegalovirus stimulates cellular thymidylate synthase gene expression in quiescent cells and requires the enzyme for replication. *J. Virol.* **74**: 4979-4987.

Gruter, W. 1924. Das Herpesvirus, seine aetiologische und klinische Bedeutung. *Muench. Med. Wochenschr.* **71**: 1058-1060.

Grzimek, N. K. A., D. Dreis, S. Schmalz, and M. J. Reddehase. 2001. Random, asynchronous, and asymmetric transcriptional activity of enhancer-flanking major immediate-early genes *ie1/3* and *ie2* during murine cytomegalovirus latency in the lungs. *J. Virol.* **75**: 2692-2705.

- Hahn, G., R. Jores, and E. S. Mocarski.** 1998. Cytomegalovirus remains latent in a common precursor of dendritic and myeloid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 3937-3942.
- Hamilton, J. D., and B. J. Seaworth.** 1985. Transmission of latent cytomegalovirus in a murine kidney tissue transplantation model. *Transplantation* **39**: 290-296.
- Hancock, K., and V. C. Tsang.** 1983. India ink staining of proteins on nitrocellulose paper. *Anal. Biochem.* **133**: 157-162.
- Hanshaw, J. B., and J. A. Dudgeon.** 1978. Congenital cytomegalovirus. *Major Probl. Clin. Pediatr.* **17**: 97-152.
- Henry, S. C., and J. D. Hamilton.** 1993. Detection of murine cytomegalovirus immediate early 1 transcripts in the spleens of latently infected mice. *J. Infect. Dis.* **167**: 950-954.
- Higashiyama, S., K. Lau, G. E. Besner, J. A. Abraham, and M. Klagsbrun.** 1992. Structure of heparin-binding EGF-like growth factor. Multiple forms, primary structure, and glycosylation of the mature protein. *The Journal of Biological Chemistry* **267(9)**: 6205-6212.
- Ho, M.** 2008. The history of cytomegalovirus and its diseases. *Med. Microbiol. Immunol.* **197**: 65-73.
- Hobom, U., W. Brune, M. Messerle, G. Hahn, and U. H. Koszinowski.** 2000. Fast screening procedures for random transposon libraries of cloned herpesvirus genomes: mutational analysis of human cytomegalovirus envelope glycoprotein genes. *J. Virol.* **74**: 7720-7729.
- Hokeness, K. L., E. S. Deweerd, M. W. Munks, C. A. Lewis, R. P. Gladue, and T. P. Salazar-Mather.** 2007. CXCR-3 dependent recruitment of antigen-specific T lymphocytes to the liver during murine cytomegalovirus infection. *J. Virol.* **81**: 1241-1250.
- Holtappels, R., M. W. Munks, J. Podlech, and M. J. Reddehase.** 2006. CD8 T-cell-based immunotherapy of cytomegalovirus disease in the mouse model of the immunocompromised bone marrow transplantation recipient. p. 383-418. In M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Holtappels, R., M. F. Pahl-Seibert, D. Thomas, and M. J. Reddehase.** 2000. Enrichment of immediate-early 1 (m123/pp89) peptide-specific CD8 T cells in a pulmonary CD62Llo memory effector cell pool during latent murine cytomegalovirus infection of the lungs. *J. Virol.* **74**: 11495-11503.

- Holtappels, R., J. Podlech, G. Geginat, H. P. Steffens, D. Thomas, and M. J. Reddehase.** 1998. Control of murine cytomegalovirus in the lungs: relative but not absolute immunodominance of the immediate-early 1 nonapeptide during the antiviral cytolytic T-lymphocyte response in pulmonary infiltrates. *J. Virol.* **72**: 7201-7012.
- Holtappels, R., D. Thomas, J. Podlech, and M. J. Reddehase.** 2002. Two antigenic peptides from genes m123 and m164 of murine cytomegalovirus quantitatively dominate CD8 T-cell memory in the H-2d haplotype. *J. Virol.* **76**: 151-164.
- Hooper, K. P., and L. Eidels.** 1996. Glutamic Acid 141 of the Diphtheria Toxin Receptor (HB-EGF Precursor) Is Critical for Toxin Binding and Toxin Sensitivity. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* **220**: 675-680.
- Hummel, M. and M. M. Abecassis.** 2002. A model for reactivation of CMV from latency. *J. Clin. Virol.* **25**: S123-S136.
- Hummel, M., Z. Zhang, S. Yan, I. Deplaen, P. Golia, T. Varghese, G. Thomas, and M. I. Abecassis.** 2001. Allogeneic transplantation induces expression of cytomegalovirus immediateearly genes in vivo: a model for reactivation from latency. *J. Virol.* **75**: 4814-4822.
- Irmiere, A., and W. Gibson.** 1983. Isolation and characterization of a noninfectious virion-like particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus. *Virology* **130**: 118-133.
- Isaacson, M. K., A. L. Feire, and T. Compton.** 2007. Epidermal growth factor receptor is not required for human cytomegalovirus entry or signaling. *J. Virol.* **81**: 6241-6247.
- Iwamoto, R., S. Higashiyama, T. Mitamura, N. Taniguchi, M. Klagsbrun, and E. Mekada.** 1994. Heparin-binding EGF-like growth factor, which acts as the diphtheria toxin receptor, forms a complex with membrane protein DRAP27/CD9, which up-regulates functional receptors and diphtheria toxin sensitivity. *The EMBO Journal* **13(10)**: 2322-2330.
- Iwamoto, R., and E. Mekada.** 2000. Heparin-binding EGF-like growth factor: a juxtacrine growth factor. *Cytokine and Growth Factor Reviews* **11**: 335-344.
- Jonjic, S., I. Bubic, and A. Krmpotic.** 2006. Innate immunity to cytomegaloviruses, p. 285-319. In M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Kato, I., and A. M. Pappenheimer Jr..** 1960. An early effect of diphtheria toxin on the metabolism of mammalian cells growing in culture. *J Exp Med.* **112**: 329-349.

- Keil, G. M., A. Ebeling-Keil, and U. H. Koszinowski. 1984. Temporal regulation of murine cytomegalovirus transcription and mapping of viral RNA synthesized at immediate early times after infection. *J. Virol.* **50**: 784-795.
- Keil, G. M., A. Ebeling-Keil, and U. H. Koszinowski. 1987. Immediate-early genes of murine cytomegalovirus: location, transcripts, and translation products. *J. Virol.* **61**: 526-533.
- Klages, K., C. T. Mayer, K. Lahl, C. Loddenkemper, M. W. Teng, S. F. Ngiow, M. J. Smyth, A. Hamann, J. Huehn, and T. Sparwasser. 2010. Selective Depletion of Foxp3+ Regulatory T Cells Improves Effective Therapeutic Vaccination against Established Melanoma. *Cancer Res.* **70(20)**: 7788-7799.
- Klemola, E., R. von Essen, G. Henle, and W. Henle. 1970. Infectious mononucleosis-like disease with negative heterophil agglutination test. Clinical features in relation to Epstein-Barr virus and cytomegalovirus antibodies. *J. Infect. Dis.* **121**: 608-614.
- Koffron, A. J., M. Hummel, B. K. Patterson, S. Yan, D. B. Kaufman, J. P. Fryer, F. P. Stuart, and M. I. Abecassis. 1998. Cellular localization of latent murine cytomegalovirus. *J. Virol.* **72**: 95-103.
- Kondo, K., H. Kaneshima, and E. S. Mocarski. 1994. Human cytomegalovirus latent infection of granulocyte-macrophage progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 11879-11883.
- Kondo, K., and E. S. Mocarski. 1995. Cytomegalovirus latency and latency-specific transcription in hematopoietic progenitors. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* **99**: 63-67.
- Kondo, K., J. Xu, and E. S. Mocarski. 1996. Human cytomegalovirus latent gene expression in granulocyte-macrophage progenitors in culture and in seropositive individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 11137-11142.
- Koszinowski U. H. , G. M. Keil, H. Volkmer, M. R. Fibi, A. Ebeling-Keil, and K. Münch. 1986. The 89,000-Mr murine cytomegalovirus immediate-early protein activates gene transcription. *J. Virol.* **58**: 59-66.
- Kouzarides, T.. 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell* **128(4)**: 693-705.
- Krmpotic, A., I. Bubic, B. Polic, P. Lucin, and S. Jonjic. 2003. Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection. *Microbes Infect.* **5**: 1263-1277.

- Kropp, K. A., C. O. Simon, A. Fink, A. Renzaho, B. Kühnapfel, J. Podlech, M. J. Reddehase, and N. K. A. Grzimek.** 2009. Synergism between the components of the bipartite major immediate-early transcriptional enhancer of murine cytomegalovirus does not accelerate virus replication in cell culture and host tissues. *J. Gen. Virol.* **90**: 2395-2401.
- Kulu, Y., J. D. Dorfman, D. Kuruppu, B. C. Fuchs, J. M. Goodwin, T. Fujii, T. Kuroda, M. Lanuti, and K. K. Tanabe.** 2009. Comparison of intravenous versus intraperitoneal administration of oncolytic herpes simplex virus 1 for peritoneal carcinomatosis in mice. *Cancer Gene Ther.* **16(4)**: 291-297.
- Kurz, S. K., M. Rapp, H. P. Steffens, N. K. A. Grzimek, S. Schmalz, and M. J. Reddehase.** 1999. Focal transcriptional activity of murine cytomegalovirus during latency in the lungs. *J. Virol.* **73**: 482-494.
- Kurz, S. K., and M. J. Reddehase.** 1999. Patchwork pattern of transcriptional reactivation in the lungs indicates sequential checkpoints in the transition from murine cytomegalovirus latency to recurrence. *J. Virol.* **73**: 8612-8622.
- Kurz, S., H. P. Steffens, A. Mayer, J. R. Harris, and M. J. Reddehase.** 1997. Latency versus persistence or intermittent recurrences: evidence for a latent state of murine cytomegalovirus in the lungs. *J. Virol.* **71**: 2980-2987.
- Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Laird, W., and N. Groman** 1976. Prophage Map of Converting Corynebacteriophage Beta. *J. Virol* **19(1)**: 208-219.
- Landolfo, S., M. Gariglio, G. Gribaudo, and D. Lembo.** 2003. The human cytomegalovirus. *Pharmacol. Ther.* **98**: 269-297.
- Lashmit, P.E., C. A. Lundquist, J. L. Meier, and M. F. Stinski.** 2004. Cellular repressor inhibits human cytomegalovirus transcription from the UL127 promoter. *J. Virol.* **78(10)**: 5113-5123.
- Lembo, D., G. Gribaudo, A. Hofer, L. Riera, M. Cornaglia, A. Mondo, A. Angeretti, M. Gariglio, L. Thelander, and S. Landolfo.** 2000. Expression of an altered ribonucleotide reductase activity associated with the replication of murine cytomegalovirus in quiescent fibroblasts. *J. Virol.* **74**: 11557-11565.

- Lemmermann, N. A. W., J. Podlech, C. K. Seckert, K. A. Kropp, N. K. A. Grzimek, M. J. Reddehase, and R. Holtappels.** 2010. CD8 T-Cell Immunotherapy of Cytomegalovirus Disease in the Murine Model, p.369-419. In D. Kabelitz and S. H. E. Kaufmann (ed.), *Methods in Microbiology, Immunology of Infection*, 3rd ed., vol. 37. Academic Press, London and San Diego, Cal.
- Lindquister, G. J., and P. E. Pellett.** 1991. Properties of the human herpesvirus 6 strain Z29 genome: G + C content, length, and presence of variable-length directly repeated terminal sequence elements. *Virology* **182**: 102-110.
- Liu, X.-F., S. Yan, M. Abecassis, and M. Hummel** 2008. Establishment of murine Cytomegalovirus Latency In Vivo associated with Changes in histone modification and recruitment of transcriptional repressors to the major immediate-early Promoter. *J. Virol.* **82(21)**: 10922-10931.
- Livak, K. J., and T. D. Schmittgen** 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta CT}$. *Method.* **25**: 402-408.
- Ljungman, P., and H. Einsele.** 1994. Cytomegalovirus infection. *Curr. Opin. Hematol.* **1**: 418-422.
- Louie, V. G., W. Yang, M. E. Bowman, and S. Choe.** 1997. Crystal Structure of the Complex of Diphtheria Toxin with an Extracellular Fragment of Its Receptor. *Molecular Cell* **1**: 67-78.
- Lundquist, C. A., J. L. Meier, and M. F. Stinski.** 1999. A strong negative transcriptional regulatory region between the human cytomegalovirus UL127 gene and the major immediate-early enhancer. *J. Virol.* **73(11)**: 9039-9052.
- Manning, W. C., and E. S. Mocarski.** 1988. Insertional mutagenesis of the murine cytomegalovirus genome: one prominent alpha gene (ie2) is dispensable for growth. *Virology* **167**: 477-484.
- Marks, J. R., and D. H. Spector.** 1984. Fusion of the termini of the murine cytomegalovirus genome after infection. *J. Virol.* **52**: 24-28.
- Marks, J. R., and D. H. Spector.** 1988. Replication of the murine cytomegalovirus genome: structure and role of the termini in the generation and cleavage of concatamers. *Virology* **162**: 98-107.
- Marrak, P., and J. Kappler.** 1987. The T cell receptor. *Science* **238**: 1073-1079.

- Martin, S. J., C. P. Reutelingsperger, A. J. Mc Gahon, J. A. Rader, R. C. Van Schie, D. M. La Face, and D. R. Green.** 1995. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med.* **182(5)**: 1545-1556.
- Masouredis, S. P.** 1959. Behavior of intravenously administered I¹³¹ diphtheria toxin in the guinea pig. *J. Immunol.* **82(4)**: 319-327.
- Mayo, D. R., J. A. Armstrong, and M. Ho.** 1977. Reactivation of murine cytomegalovirus by cyclophosphamide. *Nature* **267**: 721-723.
- Mayo, D. R., J. A. Armstrong, and M. Ho.** 1978. Activation of latent murine cytomegalovirus infection: cocultivation, cell transfer, and the effect of immunosuppression. *J. Infect. Dis.* **138**: 890-896.
- Mc Leod, M., S. Craft, and J. R. Broach.** 1986. Identification of the crossover site during FLP-mediated recombination in the *Saccharomyces cerevisiae* plasmid 2 microns circle. *Mol. Cell Biol.* **6**: 3357-3367.
- Meier, J. L.** 2001. Reactivation of the human cytomegalovirus major immediate-early regulatory region and viral replication in embryonal NTERA2 cells: role of trichostatin A, retinoic acid, and the deletion of the 21-base-pair repeats and modulator. *J. Virol.* **75**: 1581-1593.
- Ménard, C., M. Wagner, Z. Ruzsics, K. Holak, W. Brune, A. E. Campbell, and U. H. Koszinowski.** 2003. Role of murine cytomegalovirus US22 gene family members in replication in macrophages. *J. Virol.* **77(10)**: 5557-5570.
- Mendelson, M., S. Monard, P. Sissons, and J. Sinclair.** 1996. Detection of endogenous human cytomegalovirus in CD34+ bone marrow progenitors. *J. Gen. Virol.* **77**: 3099-3102.
- Mercer, J. A., C. A. Wiley, and D. H. Spector.** 1988. Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection: identification of infected cells in the spleen during acute and latent infections. *J. Virol.* **62**: 987-997.
- Messerle, M., B. Bühler, G. M. Keil, and U. H. Koszinowski.** 1992. Structural organization, expression, and functional characterization of the murine cytomegalovirus immediate-early 3. *J. Virol.* **66**: 27-36.
- Messerle, M., I. Crnkovic, W. Hammerschmidt, H. Ziegler, and U. H. Koszinowski.** 1997. Cloning, and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**:14759-14763.

- Messerle, M., G. M. Keil, and U. H. Koszinowski. 1991. Structure and expression of murine cytomegalovirus immediate-early gene 2. *J. Virol.* **65**: 1638-1643.
- Meyers, J. D., N. Flournoy, and E. D. Thomas. 1986. Risk factors for cytomegalovirus infection after human marrow transplantation. *J. Infect. Dis.* **153**: 478-488.
- Middlebrook, J.L., and R. B. Dorland. 1977. Response of cultured mammalian cells to the exotoxins of *Pseudomonas aeruginosa* and *Corynebacterium diphtheriae*: differential cytotoxicity. *Can J Microbiol.* **23(2)**: 183-189.
- Misra, V., and J. B. Hudson. 1980. Minor Base Sequence Differences between the Genomes of two strains of murine Cytomegalovirus differing in Virulence. *Archives of Virology*, **64**: 1-8.
- Mitamura, T., S. Higashiyama, N. Taniguchi, M. Klagsbrun, and E. Mekada. 1995. Diphtheria Toxin Binds to the Epidermal Growth Factor (EGF)-like Domain of Human Heparin-binding EGF-like Growth Factor/Diphtheria Toxin Receptor and Inhibits Specifically Its Mitogenic Activity. *J Biol Chem.* **270(3)**: 1015-1019.
- Mocarski, E. S., and C. T. Courcelle. 2001. Cytomegalovirus and their replication, p. 2629-2673. In *Fields Virology 4th Edition*.
- Mocarski, E. S. Jr., G. Hahn, K. Lofgren White, J. Xu, B. Slobedman, L. Hertel, S. A. Aguirre, and S. Noda. 2006. Myeloid cell recruitment and function in pathogenesis and latency, p. 465-481. In M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Mocarski, E. S., G. W. Kemble, J. M. Lyle, and R. F. Greaves. 1996. A deletion mutant in the human cytomegalovirus gene encoding IE1(491aa) is replication defective due to a failure in autoregulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93(21)**: 11321-11326.
- Mocarski, E. S., T. Shenk, and R. F. Pass. 2007. Cytomegaloviruses. p.2701-2772. In D. M. Knipe, P. M. Howley (eds.), *Fields Virology 5th Edition*. Lippincott Williams and Wilkins, New York, USA.
- Morimoto, H., and B. Bonavida. 1992. Diphtheria toxin- and *Pseudomonas A* toxin-mediated apoptosis. ADP ribosylation of elongation factor-2 is required for DNA fragmentation and cell lysis and synergy with tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol.* **149(6)**: 2089-2094.
- Morris, R. E., A. S. Gerstein, P. F. Bonventre, and C. B. Saelinger. 1985. Receptor-Mediated Entry of Diphtheria Toxin into Monkey Kidney (Vero) Cells: Electron Microscopic Evaluation. *Infection and Immunity* **50(3)**: 721-727.

- Murphy, J. C., W. Fischle, E. Verdin, and J. H. Sinclair.** 2002. Control of cytomegalovirus lytic gene expression by histone acetylation. *EMBO J.* **21**: 1112-1120.
- Mutter, W., M. J. Reddehase, F. W. Busch, H. J. Bühring, and U. H. Koszinowski.** 1988. Failure in generating hemopoietic stem cells is the primary cause of death from cytomegalovirus disease in the immunocompromised host. *J. Exp. Med.* **167**:1645-1658.
- Myerson, D., R. C. Hackmann, J. A. Nelson, D. C. Ward, and J. K. McDougall.** 1984. Widespread presence of histologically occult cytomegalovirus. *Hum. Pathol.* **15**: 430-439.
- Naglich, J. G., J. E. Metherall, D. W. Russell, and L. Eidels.** 1992. Expression Cloning of a Diphtheria Toxin Receptor: Identity with a Heparin-Binding EGF-like Growth Factor Precursor. *Cell* **69**: 1051-1061.
- Nebendahl, K.** 2000. Routes of administration. p. 463-483. In G. Krinke (ed.) *The Laboratory Rat*. Academic Press, London 463-483.
- Neiman, P. E., W. Reeves, G. Ray, N. Flournoy, K. G. Lerner, G. E. Sale, and E. D. Thomas.** 1977. A prospective analysis interstitial pneumonia and opportunistic viral infection among recipients of allogeneic bone marrow grafts. *J. Infect. Dis.* **136**: 754-767.
- Novotny, J., I. Rigoutsos, D. Coleman, and T. Shenk.** 2001. In silico structural and functional analysis of the human cytomegalovirus (HHV5) genome. *J. Mol. Biol.* **310**: 1151-1166.
- O'Connor, M., M. Peifer, and W. Bender.** 1989. Construction of large DNA segments in *Escherichia coli*. *Science* **244**: 1307-1312.
- Ogawa-Goto, K., K. Tanaka, W. Gibson, E. Moriishi, Y. Miura, T. Kurata, S. Irie, and T. Sata.** 2003. Microtubule network facilitates nuclear targeting of human cytomegalovirus capsid. *J. Virol.* **77**: 8541-8547.
- Oliner, J D., K. W. Kinzler, and B. Vogelstein.** 1993. In vivo cloning of PCR products in *E. coli*. *Nucleic Acids Res.* **21**: 5192-5197.
- Pass, R. F.** 2001. Cytomegalovirus. In *Fields Virology 4th Edition*. **Vol 2**: 2675-2705.
- Pellett, P. E., and B. Roizman.** 2007. The family: Herpesviridae a brief introduction. p.2479-2500. In D. M. Knipe, P. M. Howley (eds.), *Fields Virology 5th Edition*. Lippincott Williams and Wilkins, New York, USA.

Percivalle, E., M. G. Revello, L. Vago, F. Morini, and G. Gerna. 1993. Circulating endothelial giantcells permissive for human cytomegalovirus (HCMV) are detected in disseminated HCMV infections with organ involvement. *J. Clin. Invest.* **92**: 663-670.

Peterson, P. K., H. H. Balfour, Jr., S. C. Marker, D. S. Fryd, R. J. Howard, and R. L. Simmons. 1980. Cytomegalovirus disease in renal allograft recipients: a prospective study of the clinical features, risk factors and impact on renal transplantation. *Medicine* **59**: 283-300.

Plummer, G.. 1967. Comparative virology of the herpes group. *Prog. Med. Virol.* **9**: 302-340.

Pluskal, M. G.. 1986. Immobilon PVDF transfer membrane: A new membrane substrate for blotting of proteins. *BioTechniques* **4**: 272-283.

Podlech, J., R. Holtappels, N. K. A. Grzimek, and M. J. Reddehase. 2002. Animal models: murine cytomegalovirus, p.493-525. In S. H. E. Kaufmann and D. Kabelitz (ed.), *Methods in Microbiology, Immunology of Infection*, 2nd ed., vol. 32. Academic Press, London and San Diego, Cal.

Podlech, J., R. Holtappels, M. F. Pahl-Seibert, H. P. Steffens, and M. J. Reddehase. 2000. Murine model of interstitial cytomegalovirus pneumonia in syngeneic bone marrow transplantation: persistence of protective pulmonary CD8-T-cell infiltrates after clearance of acute infection. *J. Virol.* **74**: 7496-7507.

Podlech, J., R. Holtappels, N. Wirtz, H. P. Steffens, and M. J. Reddehase. 1998. Reconstitution of CD8 T cells is essential for the prevention of multiple-organ cytomegalovirus histoathology after bone marrow transplantation. *J. Gen. Virol.* **79**: 2099-2104.

Polic, B., H. Hengel, A. Krmpotic, J. Trgovich, I. Pavic, P. Luèin, S. Jonjic, and U. H. Koszinowski. 1998. Hierarchical and redundant lymphocyte subset control precludes cytomegalovirus replication during latent infection. *J. Exp. Med.* **188**: 1047-1054.

Pollard, R. B.. 1988. Cytomegalovirus infections in renal, heart, heart-lung and liver transplantation. *Pediatr. Infect. Dis.* **7**: 97-102.

Pollock, J. L., R. M. Presti, S. Paetzold, and H. W. Virgin IVth. 1997. Latent murine cytomegalovirus infections in macrophages. *Virology* **227**: 168 -179.

Pollock, J. L., and H. W. Virgin IV. 1995. Latency, without persistence, of murine cytomegalovirus in the spleen and kidney. *J. Virol.* **69**: 1762-1768.

- Pósfai, G., M. D. Koob, H. A. Kirkpatrick, and F. R. Blattner.** 1997. Versatile insertion plasmids for targeted genome manipulations in bacteria: isolation, deletion, and rescue of the pathogenicity island LEE of the *Escherichia coli* O157:H7 genome. *J. Bacteriol.* **179**:4426-4428.
- Quinnan, G. V., J. E. Manischewitz, and F. A. Ennis.** 1978. Cytotoxic T lymphocyte response to murine cytomegalovirus infection. *Nature* **273**: 541-543.
- Raab, G., and M. Klagsbrun.** 1997. Heparin-binding EGF-like growth factor. *Biochim Biophys Acta.* **1333**: 179-199.
- Raftery, M. J., M. Schwab, S. M. Eibert, Y. Samstag, H. Walczak, and G. Schonrich.** 2001. Targeting the function of mature dendritic cells by human cytomegalovirus: a multilayered viral defense strategy. *Immunity* **15**: 997-1009.
- Rawlinson, W. D., H. E. Farrell, and B. G. Barrell.** 1996. Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus. *J. Virol.* **70**: 8833-8849.
- Reddehase, M. J.** 2002. Antigen and immunoevasins: opponents in cytomegalovirus immune surveillance. *Nat. Rev. Immunol.* **2**: 831-844.
- Reddehase, M. J., M. Balthesen, M. Rapp, S. Jonjic, I. Pavic, and U. H. Koszinowski.** 1994. The conditions of primary infections define the load of latent viral genome in organs and the risk of recurrent cytomegalovirus disease. *J. Exp. Med.* **179**: 185-193.
- Reddehase, M. J., W. Mutter, K. Münch, H. J. Buhring, and U. H. Koszinowski.** 1987. CD8 positive T lymphocytes specific for murine cytomegalovirus immediate-early antigens mediate protective immunity. *J. Virol.* **61**: 3102-3108.
- Reddehase, M. J., J. Podlech, and N. K. A. Grzimek.** 2002. Mouse models of cytomegalovirus latency: overview. *J. Clin. Virol.* **25**: 23-36.
- Reddehase, M. J., J. B. Rothbard, and U. H. Koszinowski.** 1989. A pentapeptide as minimal antigenic determinant for MHC class I-restricted T lymphocytes. *Nature* **337**: 651-653.
- Reddehase, M. J., C. O. Simon, C. K. Seckert, N. Lemmermann, and N. K. Grzimek.** 2008. Murine model of cytomegalovirus latency and reactivation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **325**: 315-331.
- Reddehase, M. J., F. Weiland, K. Münch, S. Jonjic, A. Lüske, and U. H. Koszinowski.** 1985. Interstitial murine cytomegalovirus pneumonia after irradiation: characterization of cells that limit viral replication during established infection of the lungs. *J. Virol.* **55**: 264-273.

- Reeves, M. B., and J. H. Sinclair. 2008. Aspects of human cytomegalovirus latency and reactivation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **325**: 297-313.
- Reeves, M. B., and J. H. Sinclair. 2010. Analysis of latent viral gene expression in natural and experimental latency models of human cytomegalovirus and its correlation with histone modifications at a latent promoter. *J. Gen. Virol.* **91**: 599-604.
- René, E., C. Marche, T. Chevalier, C. Rouzioux, B. Regnier, A. G. Saimot, Y. Negesse, S. Matheron, C. Leport, B. Wolff, and et al. 1988. Cytomegalovirus colitis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Dig. Dis. Sci.* **33**: 741-750.
- Roizman B., and J. Baines. 1991. The diversity and unity of Herpesviridae. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **14**: 63-79.
- Roizman, B., and W. Batterson. 1986. Herpesviruses and their replication, p. 607-636. In Fields, B. N. and D. M. Knipe (eds.), *Fundamental Virology*, Raven Press, New York.
- Roizman, B., R. Desrosiers, B. Fleckenstein, and C. Lopez. 1992. The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol.* **123**: 425-449.
- Roizman, B., and A. E. Sears. 1987. An inquiry into the mechanisms of herpes simplex virus latency. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**: 543-571.
- Sacher, T., J. Podlech, C A. Mohr, S. Jordan, Z. Ruzsics, M. J. Reddehase, and U. H. Koszinowski. 2008. The major virus-producing cell type during murine cytomegalovirus infection, the hepatocyte, is not the source of virus dissemination in the host. *Cell Host Microbe.* **3**(4): 263-272.
- Saiki, R. K., P. S. Walsh, C. H. Levenson, and H. A. Erlich. 1988. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**: 6230-6234.
- Saito, M., T. Iwawaki, C. Taya, H. Yonekawa., M. Noda, Y. Inui, E. Mekada, Y. Kimata, A. Tsuru, and K. Kohno 2001. Diphtheria toxin receptor-mediated conditional and targeted cell ablation in transgenic mice. *Nature biotechnology* **19**: 746-750.
- Sambrook, J., and D. W. Russel 2001. *Molecular Cloning: A laboratory manual* 3rd ed.. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Santos-Rosa, H., R. Schneider, A. J. Bannister, J. Sherriff, B. E. Bernstein, N. C. Emre, S. L. Schreiber, J. Mellor, and T. Kouzarides. 2002. Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* **419(6905)**: 407-411.

Sarov, I., and I. Abady. 1975. The morphogenesis of human cytomegalovirus. Isolation and polypeptide characterization of cytomegalovirions and dense bodies. *Virology* **66**: 464-473.

Schneweis, K. E.. 1962. Serologische Untersuchungen zur Typendifferenzierung des Herpesvirus Hominis. *Z. Immunitätsforsch. Exp. Ther.* **124**: 24-48.

Schumacher, U., W. Handke, I. Jurak, and W. Brune 2010. Mutations in the M112/M113-Coding Region Facilitate Murine Cytomegalovirus Replication in Human Cells. *J. Virol.* **84**: 7994-8006.

Seckert, C. O., A. Renzaho, M. J. Reddehase, and N. K. Grzimek. 2008. Hematopoietic stem cell transplantation with latently infected donors does not transmit virus to immunocompromised recipients in the murine model of cytomegalovirus infection. *Med. Microbiol. Immunol.* **197**: 251-259.

Seckert, C. O., A. Renzaho, H.-M. Tervo, C. Krause, P. Deegen, B. Kühnapfel, M. J. Reddehase, and N. K. Grzimek. 2009. Liver sinusoidal cells are a site of murine cytomegalovirus latency and reactivation. *J. Virol.* **83(17)**: 8869-8884.

Simon, C. O. 2005. Generierung und Charakterisierung von rekombinanten Cytomegaloviren mit Punktmutationen in antigenen Peptiden. Dissertation

Simon, C. O., R. Holtappels, H.-M. Tervo, V. Böhm, T. Däubner, S. A. Oehrlein-Karpi, B. Kühnapfel, A. Renzaho, D. Strand, J. Podlech, M.. Reddehase, and N. K. Grzimek. 2006a. CD8 T cells control cytomegalovirus latency by epitope-specific sensing of transcriptional reactivation. *J. Virol.* **80**: 10436-10456.

Simon, C. O., C. K. Seckert, D. Dreis, M. J. Reddehase, and N. K. A. Grzimek. 2005. Role for tumor necrosis factor alpha in murine cytomegalovirus transcriptional reactivation in latently infected lungs. *J. Virol.* **79**: 326-340.

Simon, C. O., C. K. Seckert, N. K. A. Grzimek, and M. J. Reddehase. 2006b. Murine model of cytomegalovirus latency and reactivation: the silencing/desilencing and immune sensing hypothesis. p. 483-500. In M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.

- Singh, N., J. S. Dummer, S. Kusne, M. K. Breinig, J. A. Armstrong, L. Makowka, M. Startzl, and M. Ho.** 1988. Infections with cytomegalovirus and other herpesviruses in 121 liver transplant recipients: transmission by donated organ and the effect of OKT3 antibodies. *J. Infect. Dis.* **158**: 124-131.
- Sinzger, C., A. Grefte, B. Plachter, A. S. Gouw, T. H. The, and G. Jahn.** 1995. Fibroblasts, epithelial cells endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *J. Gen. Virol.* **76**: 741-750.
- Sinzger, C., and G. Jahn.** 1996. Human cytomegalovirus cell tropism and pathogenesis. *Intervirology* **39**: 302-319.
- Sison, R. F., G. N. Holland, L. J. MacArthur, N. C. Wheeler, and M. S. Gottlieb.** 1991. Cytomegalovirus retinopathy as the initial manifestation of the acquired immunodeficiency syndrome. *Am. J. Ophthalmol.* **112**: 243-249.
- Slobedman, B., and E. S. Mocarski.** 1999. Quantitative analysis of latent human cytomegalovirus. *J. Virol.* **73**: 4806-4812.
- Smith, G. R..** 1988. Homologous recombination in procaryotes. *Microbiol. Rev.* **52**: 1-28.
- Smith, M. G..** 1954. Propagation of salivary gland virus of the mouse in tissue cultures. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **86**: 435-440.
- Smith, M. G..** 1956. Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **92**: 424-430.
- Smith P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, and M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, and D. C. Klenk.** 1985. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal. Biochem.* **150**: 76-85.
- Soderberg-Naucler, C., K. N. Fish, and J. A. Nelson.** 1997. Interferon- γ and tumor necrosis factor- α specifically induce formation of cytomegalovirus-permissive monocyte-derived macrophages that are refractory to the antiviral activity of these cytokines. *J. Clin. Invest.* **100**: 3154-3163.
- Spector, S. A., K. Hsia, M. Crager, M. Pilcher, S. Cabral, and M. J. Stempien.** 1999. Cytomegalovirus (CMV) DNA load is an independent predictor of CMV disease and survival in advanced AIDS. *J. Virol.* **73**: 7027-7030.

Stagno, S., and R. J. Whitley. 1985. Herpesvirus infections of pregnancy. Part I: Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infections. *N. Engl. J. Med.* **313**: 1270-1274.

Stenmark, H., S. Olsnes, and K. Sandvig. 1988. Requirement of Specific Receptors for Efficient Translocation of Diphtheria Toxin A Fragment across the Plasma Membrane. *The Journal of Biological Chemistry.* **263(26)**: 13449-13455. Printed in U.S.A.

Stinski, M. F., C. L. Malone, T. W. Hermiston, and B. Liu. 1991. Regulation of human cytomegalovirus transcription, p. 245-260. In Wagner E.K. (ed.), *Herpesvirus transcription and its control.* Boca Raton: CRC Press.

Streblow, D. N., and J. A. Nelson. 2003. Models of HCMV latency and reactivation. *Trends Microbiol.* **11**: 293-295.

Streblow, D., S. M. Varnum, R. D. Smith, and J. A. Nelson. 2006. A proteomics analysis of human cytomegalovirus particles, p.63-89. In M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology.* Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.

Sugawara, N., G. Ira, and J. E. Haber. 2000. DNA length dependence of the single-strand annealing pathway and the role of *Saccharomyces cerevisiae* RAD59 in double-strand break repair. *Mol. Cell Biol.* **20**: 5300-5309.

Swaminathan, S., and S. K. Sharan. 2004. Bacterial Artificial Chromosome Engineering, p.89-106. In S. Zhao, and M. Stodolsky (ed.), *Bacterial Artificial Chromosomes, Methods Mol. Biol.,* vol. 256. Totowa, Humana Press NJ, USA.

Tang, Q., E. A. Murphy, and G. G. Maul. 2006. Experimental confirmation of global murine cytomegalovirus open reading frames by transcriptional detection, and partial characterization of newly described gene products. *J. Virol.* **80**: 6873-6882.

Taylor-Wiedeman, J. A., J. G. P. Sissons, and J. H. Sinclair. 1994. Induction of endogenous human cytomegalovirus gene expression after differentiation of monocytes from healthy carriers. *J. Virol.* **68**: 1597-1604.

Tooze, J., M. Hollinshead, B. Reis, K. Radsak, and H. Kern. 1993. Progeny vaccinia and human cytomegalovirus particles utilize early endosomal cisternae for their envelopes. *Eur. J. Cell Biol.* **60**: 163-178.

Valchanova, R. S., M. Picard-Maureau, M. Budt, and W. Brune. 2006. Murine cytomegalovirus m142 and m143 are both required to block protein kinase R-mediated shutdown of protein synthesis. *J. Virol.* **80(20)**: 10181-10190.

- Van Regenmortel, M. H. V., C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle, and R. B. Wickner.** 2000. *Virus taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses 2000*. Academic Press.
- Verhoven, B., R. A. Schlegel, and P. Williamson.** 1995. Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **182(5)**: 1597-1601.
- Vermes, I., C. Haanen, H. Steffens-Nakken, and C. Reutelingsperger.** 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods.* **184(1)**: 39-51.
- Wagner, M., S. Jonjic, U. H. Koszinowski, and M. Messerle.** 1999. Systematic excision of vector sequences from the BAC-cloned herpesvirus genome during virus reconstitution. *J. Virol.* **73**: 7056-7060.
- Wagner, M., and U. H. Koszinowski.** 2004. Mutagenesis of viral BACs with linear PCR fragments (ET recombination). *Methods in Mol. Biol.* **256**: 257-268.
- Wang, X., S.-M. Huong, M. L. Chiu, N. Raab-Traub, and E.-S. Huang.** 2003. Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature* **424**: 456-461.
- Waynforth, H. B., and P. A. Flecknell.** 1992. General aspects of the administration of drugs and other substances, p. 1-67. In Waynforth, H. B., and P. A. Flecknell (eds.), *Experimental and Surgical Technique in the Rat*. Academic Press, London.
- Weiland, F., G. M. Keil, M. J. Reddehase, and U. H. Koszinowski.** 1986. Studies on the morphogenesis of murine cytomegalovirus. *Inter. Virology* **26**: 192-201.
- Weller, T. H., J. B. Hanshaw, and D. E. Scott.** 1960. Serologic differentiation of viruses responsible for cytomegalic inclusion disease. *Virology* **12**: 130-132.
- Weller, T. H.** 1970. Cytomegaloviruses: the difficult years. *J. Infect. Dis.* **122**: 532-539.
- Welsh, R. M., J. O. Brubaker, M. Vargas-Cortes, and C. L. O'Donnell.** 1991. Natural killer (NK) cell response to virus infections in mice with severe combined immunodeficiency. The stimulation of NK cells and the NK cell-dependent control of virus infections occur independently of T and B cell function. *J. Exp. Med.* **173**: 1053-1063.

- White, K. L., B. Slobedman, and E. S. Mocarski.** 2000. Human cytomegalovirus latency-associated protein pORF94 is dispensable for productive and latent infection. *J. Virol.* **74**: 9333-9337.
- Wilfinger, W. W., K. Mackey, and P. Chomczynski.** 1997. Effect of pH , and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* **22**: 474-476, 478-481.
- Wolfensohn, S., and M. Lloyd.** 1994. Conduct of minor procedures. p. 143-173. In Wolfensohn, S., and M. Lloyd (eds.) *Handbook of Laboratory Animals Management and Welfare*. Oxford University Press, Oxford.
- Woodard, G..** 1965. p. 343-359. In Gay, W. J. (ed.) *Methods of Animal Experimentation*, Vol. 1. Academic Press, New York.
- Wright, J. F., A. Kurosky, E. L. Pryzdial, and S. Wasi.** 1995. Host cellular annexin II is associated with cytomegalovirus particles isolated from cultured human fibroblasts. *J. Virol.* **69**: 4784-4791.
- Wright, J. F., A. Kurosky, and S. Wasi.** 1994. An endothelial cell-surface form of annexin II binds human cytomegalovirus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **198**: 983-989.
- Wyllie, A. H., R. G. Morris, A. L. Smith, and D. Dunlop.** 1984. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J. Pathol.* **142(1)**: 67-77
- Yagyu, K., M. Takeshita, T. Otsuka, H. Kubota, A. Furuse, and P. J. van Breda Vriesman.** 1994. Reactivation of latent cytomegalovirus in allografts: comparison of lung graft and kidney graft in rats. *Transplant. Proc.* **26**: 2343-2344.
- Yamaizumi, M., E. Mekada, T. Uchida, and Y. Okada.** 1978. One Molekule of Diphtheria Toxin Fragment A Introduced into a Cell can kill the Cell. *Cell* **15**: 245-250.
- Yamaizumi, M., T. Uchida, K. Takamatsu, and Y. Okada.** 1982. Intracellular stability of diphtheria toxin fragment A in the presence and absence of anti-fragment A antibody. *Cell Biology* **79**: 461-465.
- Yuhasz, S. A., V. B. Dissette, M. L. Cook, and J. G. Stevens.** 1994. Murine cytomegalovirus is present in both chronic active and latent states in persistently infected mice. *Virology* **202**: 272-280.

Zaia, J. A., and S. J. Forman. 1995. Cytomegalovirus infection in the bone marrow transplant recipient. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* **9**: 879-900.

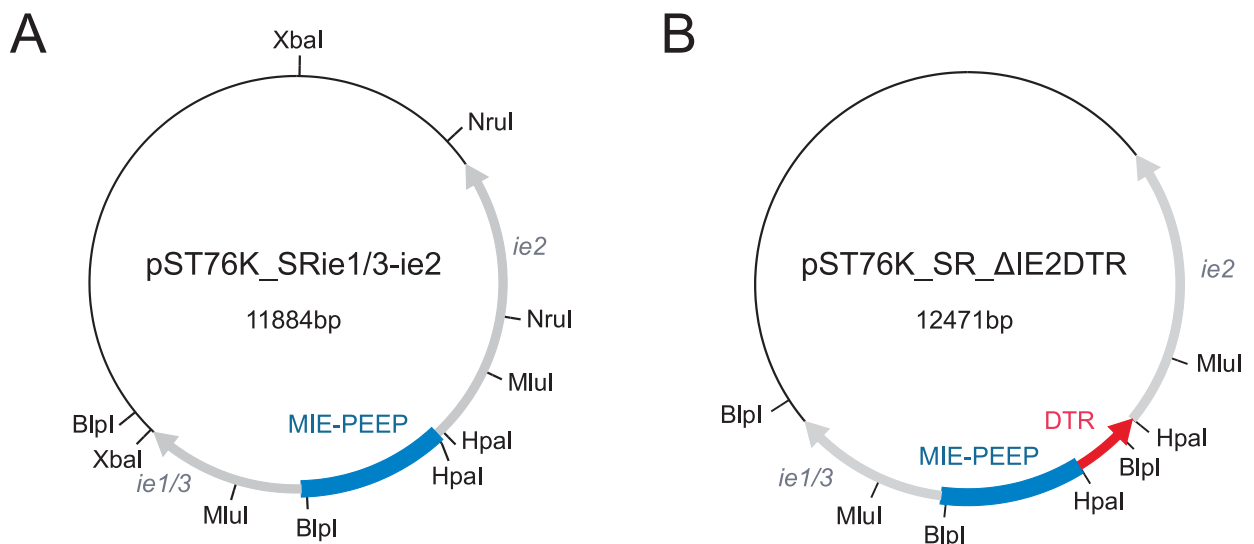
Zhang, Y., F. Buchholz, J. P. Muyrers, and A. F. Stewart. 1998. A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nat. Gent.* **20**: 123-128.

Zimmermann, K., D. Schogl, and J. W. Mannhalter. 1998. Digestion of terminal endonuclease recognition sites on PCR products. *Biotechniques* **4**: 582-584.

Anhang A

Sequenzen, Plasmidkarten und Original-Versuchsdaten

A.1 Plasmidkarte A) Zwischenkonstrukt pST76K_SRie1/3-*ie2* und B) *shuttle*-Plasmid pST76K_SR_ΔIE2DTR



A.2 Sequenzausschnitt mCMV_ΔIE2DTR

```

n 184.188 gcaaattagg ggatttcagt gcatttggca ttaaaaacta ttggttctag tcataaaacg
>.....MIE-PEEP.....>

          HpaI
ggcggagtta accatataaa agctgctccc catgccattc gaaccatgaa gctgctgccg
>.MIE-PEEP.>>
          >>.....ie2-Promotor.....>>
                                Start >>>
                                >>....DTR.....>

togggtgtgc tgaagctcct tctggtgca gttctttcgg cactgggtgac tggcgagagc
>.....DTR.....>

ctggagcagc ttccgagagg gctagctgct ggaaccagca acccggaccc ttccactgga
>.....DTR.....>

tctacggacc agctgctacg cctaggaggc gcccgggacc ggaaagtccg tgacttgcaa
>.....DTR.....>

gaggcagatc tggacctttt gagagtcaact ttatcctcca agccacaagc actggccaca
>.....DTR.....>

ccaagcaagg agggagcacg gaaaagaaag aagaaaggca agggactagg gaagaagagg
>.....DTR.....>

gacctatgtc ttccgaaata caaggacttc tgcattccac gagaatgcaa atatgtgaag
>.....DTR.....>

gagctccggg ctcccctctg catctgccac ccagggtacc atggagagag gtgtcatggg
>.....DTR.....>

ctgagcctcc cagtggaaaa tcgcttatat acctatgacc atacaactat cctggctgtg
>.....DTR.....>

gtggccgtgg tgctgtcttc tgtctgtctg ctggctcatg tggggcttct catgtttagg
>.....DTR.....>

taccatagga gaggtgggta tgatgtgaa aacgaagaga aagtgaagtt gggcatgact
>.....DTR.....>

          HpaI
aattcccact gagttaacga gcgggtgaac ggagcccccc aggccgggta aggttgcat
>....DTR.....>
          >>.....'ie2'.....>

gggctcggct atgggacggg gatttggccc ggtactttaa tatgggtggg gtcttatggg n 184.420
>.....'ie2'.....>

```

A.3 Sequenzausschnitt mCMV_ΔIE2DTR-HA

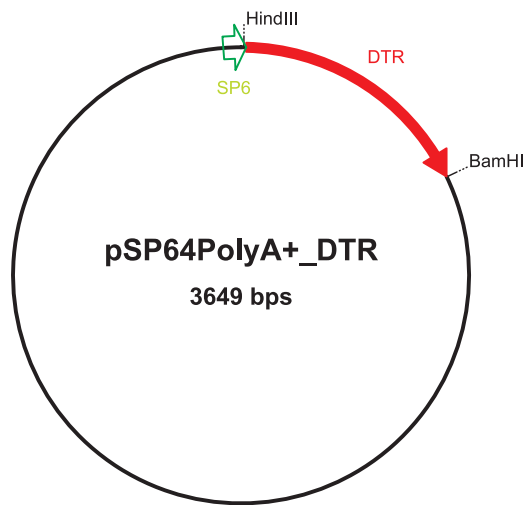
```

n 184.241 aaaactattg gttctagtca taaaacgggc ggagttaacc atataaaagc tgctccccat
                                          ie2-Promotor
gccattcgaa ccatgaagct gctgccgtcg gtggtgctga agctccttct ggctgcagtt
ctttcggcac tggtgactgg cgagagcctg gaggagcttc ggagagggct agctgctgga
accagcaacc cggacccttc cactggatct acggaccagc tgctacgcct aggaggcggc
cgggaccgga aagtccgtga cttgcaagag gcagatctgg accttttgag agtcacttta
tctccaagc cacaagcact ggccacacca agcaaggagg agcacgggaa aagaaagaag
aaaggcaagg gactagggaa gaagagggac ccatgtcttc ggaaatacaa ggacttctgc
                                          DTR
atccacggag aatgcaaata tgtgaaggag ctccgggctc cctcctgcat ctgccacca
ggttaccatg gagagaggtg tcatgggctg agcctcccag tggaaaatcg cttatatacc
tatgaccata caactatcct ggctgtggtg gccgtggtgc tgcctctgt ctgtctgctg
gtcatcgtgg ggcttctcat gtttaggtac cataggagag gtggttatga tgtgaaaaac
gaagagaaag tgaagttggg catgactaat tccaactacc catacgacgt cccagactac
                                          HA-tag
gcttgaagga cgacgaogac aagtaagaag ttcctattct ctagaagta taggaacttc
neues Stop Priming Region pG704Kan
                                          >>.....FRT-Site.....>>
gaattcccat gtcagccggt aagtgttct gtgagttaac gagcgggtga acggagcccc
                                          altes Stop
ccaggccggg taaggttga ttgggctcgg ctatgggacg gggatttggc ccggtacttt n 184.398
                                          ie2

```

A.4 Klonierung des pSP64PolyA⁺_DTR

A



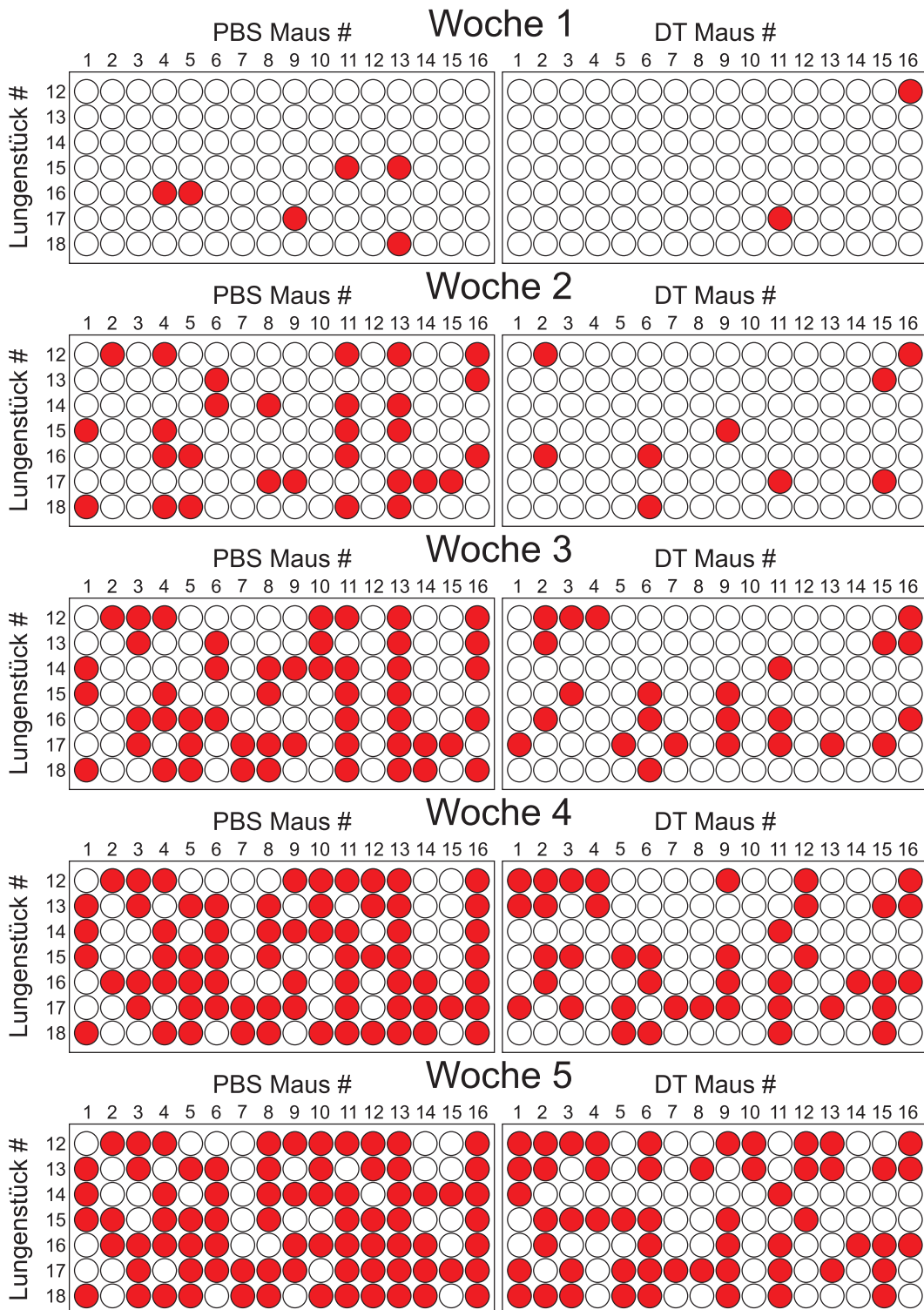
B

```

1  gaatacaagc ttaccatgaa gctgctgccg tcggtggtgc tgaagctoct tctggctgca
   >>.....DTR.....>
61  gttctttcgg cactggtgac tggcgagagc ctggagcagc ttcggagagg gctagctgct
   >.....DTR.....>
121 ggaaccagca acccggacce ttccactgga tctacggacc agctgctacg cctaggaggc
   >.....DTR.....>
181 ggccgggacc ggaaagtccg tgacttgcaa gaggcagatc tggacctttt gagagtcact
   >.....DTR.....>
241 ttatcctcca agccacaagc actggccaca ccaagcaagg aggagcacgg gaaaagaaag
   >.....DTR.....>
301 aagaaaggca agggactagg gaagaagagg gacctatgct ttcggaaata caaggacttc
   >.....DTR.....>
361 tgcattccacg gagaatgcaa atatgtgaag gagctccggg ctcctctctg catctgccac
   >.....DTR.....>
421 ccaggttacc atggagagag gtgtcatggg ctgagcctcc cagtggaaaa tcgcttatat
   >.....DTR.....>
481 acctatgacc atacaactat cctggctgtg gtggccgtgg tgetgtcctc tgtctgtctg
   >.....DTR.....>
541 ctggtcatcg tggggcttct catgtttagg taccatagga gaggtgggta tgatgtgaa
   >.....DTR.....>
601 aacgaagaga aagtgaagtt gggcatgact aattcccacc cggatctcag acggatcccc
   >.....DTR.....>>
661 gggcgagctc ccaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaccgaatc gtaatcatgt
721 catagctggt tctgtgtgta aattggtatc cgctcacaat tccacacaac atacgagccg
781 gaagcataaa gtgtaaagcc tggggtgcct aatgagtgag ctaactcaca ttaattgcgt
841 tgcgctcact gcccgctttc cagtccggaa acctgtcgtg ccagctgcat taatgaatcg
901 gccaacgcgc ggggagaggc gttttgcgta ttgggcgctc ttccgcttcc tcgctcactg

```

A.5 Virusreaktivierung aus Lungenexplantatkulturen





Poster und Vorträge

Sabine Scheller, Christian O. Simon, Jürgen Podlech, Petra Deegen, und Natascha K. A. Grzimek. 2008. In vivo conditional depletion of latent murine cytomegalovirus. 18. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Heidelberg (poster presentation).

Sabine Scheller, Christian O. Simon, Birgit Kühnapfel, Dorothea Gendig, Jürgen Podlech, Petra Deegen, und Natascha K. A. Grzimek. 2008. In vivo conditional depletion of latent murine cytomegalovirus. 3. Mini Herpesvirus Workshop, Berlin (oral presentation).

Sabine Scheller, Christian O. Simon, Birgit Kühnapfel, Jürgen Podlech, Matthias J. Reddehase, und Natascha K. A. Grzimek. 2009. In vivo conditional depletion of latent murine cytomegalovirus. 19. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Leipzig (poster presentation).

Sabine Scheller, Christian O. Simon, Jürgen Podlech, Dorothea Gendig, Birgit Kühnapfel, Matthias J. Reddehase, und Natascha K. A. Grzimek-Koschewa. 2009. In vivo conditional depletion of latent murine cytomegalovirus. 12th Int. Cytomegalovirus and Betaherpesvirus Workshop, Boston, MA, USA (poster presentation Natascha K. A. Grzimek).

Sabine Scheller, Verena Böhm, Kai Kropp, Christof K. Seckert, Stefan Ebert, Christian O. Simon, Birgit Kühnapfel, Natascha K. A. Grzimek, und Matthias J. Reddehase. 2009. In vivo conditional modulation of CD8 T cell priming with death-tagged murine CMV defines the kinetics of the antiviral immune response. 34th Annual International Herpesvirus Workshop. Ithaca, NY, USA (oral presentation).

Sabine Scheller, Christian O. Simon, Birgit Kühnapfel, Jürgen Podlech, Matthias J. Reddehase, und Natascha K. A. Grzimek. 2010. In vivo conditional depletion of latent death-tagged murine cytomegalovirus. 4th European Congress of Virology, Cernobbio, Italien (poster presentation Natascha K. A. Grzimek).

Sina I. Schader, Doris Thomas, Sabine Scheller, Christof K. Seckert, Jürgen Podlech, Matthias J. Reddehase, und Rafaela Holtappels. 2010. Control of murine cytomegalovirus infection after allogeneic bone marrow transplantation. 35th Annual International Herpesvirus Workshop, Salt Lake City, Utah, USA (poster presentation).

Sabine Scheller, Christian O. Simon, Birgit Kühnapfel, Jürgen Podlech, Matthias J. Reddehase, und Natascha K. A. Grzimek. 2010. In vivo conditional depletion of latent death-tagged murine cytomegalovirus. 35th Annual International Herpesvirus Workshop, Salt Lake City, Utah, USA (oral presentation).

Marion Grießl, Christof K. Seckert, Sabine Scheller, Angélique Renzaho, Jürgen Podlech, Matthias J. Reddehase, und Natascha K. A. Grzimek. 2010. Cell type-specific conditional virus recombination and cell depletion in Cre-transgenic mice: A new approach in analyzing cytomegalovirus latency. 5. Mini Herpesvirus Workshop, Berlin (oral presentation Marion Grießl).

Marion Grießl, Christof K. Seckert, Sabine Scheller, Angélique Renzaho, Jürgen Podlech, Matthias J. Reddehase, und Natascha K. A. Grzimek. 2011. Cell type-specific conditional virus recombination and cell depletion in Cre-transgenic mice: A new approach in analyzing cytomegalovirus latency. 19. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Freiburg (poster presentation Marion Grießl).

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen oder anderen Quellen entnommen sind, sind als solche eindeutig kenntlich gemacht. Die Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Form noch nicht veröffentlicht und noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegt worden.

Sabine Scheller
Mainz, August 2011