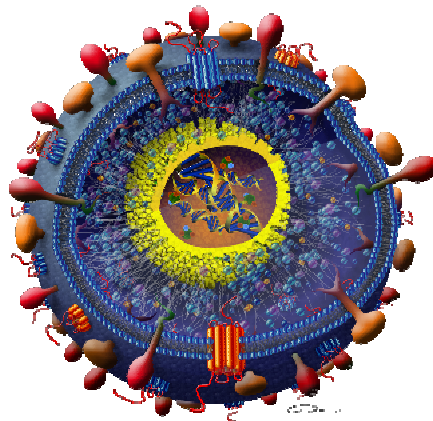


Generierung und Charakterisierung
von rekombinanten Cytomegaloviren mit
Punktmutationen in antigenen Peptiden



Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt
von

Christian Oliver Simon
geb. am 27.01.1972 in Birkenfeld (RLP)

Mainz, 2005

Dekan: Prof. Dr. NN

1. Berichtserstatter: Prof. Dr. NN

2. Berichtserstatter: Prof. NN

Tag der mündlichen Prüfung : 09.01.2006

Meiner Frau
und meinen Eltern

*Die Natur ist unerbittlich und unveränderlich,
und es ist ihr gleichgültig, ob die verborgenen Gründe
und Arten ihres Handelns dem Menschen
verständlich sind oder nicht.*

GALILEO GALILEI MATHEMATIKER, PHYSIKER UND ASTRONOM (1564 - 1642)

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Virologie der Universität Mainz angefertigt.

Teile der Dissertation sind bereits veröffentlicht:

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. 2006. Murine model of cytomegalovirus latency and reactivation: the silencing/desilencing and immune sensing hypothesis. Chapter 23 *In Cytomegaloviruses: Molecular Biology and Immunology* (M. J. Reddehase, ed.). Caister Academic Press, Norfolk, U. K.

Zusammenfassung

Die Kontrolle der produktiven Cytomegalovirus- (CMV) Infektion ist von der effizienten Rekonstitution antiviraler CD8 T-Zellen abhängig. Dies führt jedoch nicht zur vollständigen Eliminierung des viralen Genoms aus den Zielorganen, sondern das Virus verbleibt in einem nicht-replikativen Zustand: der Latenz. Es ist bekannt, dass während der Latenz nur ein geringer Anteil latenter mCMV-Genome in der Lunge die *Major Immediate Early* (MIE) Gene *ie1* und *ie2* exprimiert, die Latenz aber dennoch bestehen bleibt, weil das differentielle *Splicing* des primären IE1/3-Transkripts zum Transaktivator-Transkript IE3 nicht erfolgt. Damit war neben der Initiation der IE-Genexpression am MIE-Promotor-Enhancer das IE1/3-*Splicing* als zweiter molekularer Latenz-Kontrollpunkt identifiziert. Parallel zur Latenz-assoziierten IE1-Genexpression sind in der Lunge aktivierte CD62L-*low* CD8 T-Zellen mit Spezifität für das immundominante IE1-Peptid 168-YPHFMPTNL-176 angereichert.

Dies legte die Hypothese nahe, dass neben der molekularen Kontrolle der Latenz auch eine immunologische Kontrolle, beispielsweise durch IE1-Epitop-spezifische CD8 T-Zellen besteht. Zur Evaluierung dieser Hypothese wurde in der vorliegenden Arbeit mittels BAC-Mutagenese erstmals ein rekombinantes mCMV generiert, in dem das IE1-Peptid durch Punktmutation der C-terminalen MHC-Ankeramino-säure L176A zerstört ist. Dazu musste zunächst die Technik der BAC-Mutagenese herpesviraler Genome (in Anlehnung an die publizierten Arbeiten von Messerle et al., 1997; Borst et al., 1999, 2004; Wagner et al., 1999) in der Arbeitsgruppe etabliert werden. Neben der Funktionsverlust-Mutante (mCMV-IE1-L176A) wurden zur Kontrolle zwei Revertanten (mCMV-IE1-A176L und mCMV-IE1-A176L*) generiert. In letzterer, als *Wobble*-Revertante bezeichnet, wird wieder die authentische MHC-Ankeramino-säure L eingesetzt, es verbleibt aber ein singulärer Nukleotidaustausch A→T in der *Wobble*-Position des Codons als Marker zur Unterscheidung zum WT-mCMV zurück.

Der immunologische Phänotyp der Funktionsverlust-Mutante, also die funktionelle Auslöschung des antigenen IE1-Peptids im *Priming* einer CD8 T-Zell-Antwort, entsprach der Erwartung. Entsprechend konnte nach Infektion mit der Funktionsverlust-Mutante keine Reaktivität gegen das IE1-Peptid nachgewiesen werden. In den Revertanten hingegen war die Erkennung des IE1-Peptids wieder hergestellt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen weiter, dass die Funktionsverlust-Mutante sowie die Revertanten ohne signifikante Beeinflussung *in vitro* in permissiven Fibroblasten und *in vivo* in verschiedenen Geweben replizieren.

Wie aktuelle Daten nach Knochenmarktransplantation und Infektion mit der Funktionsverlust-Mutante im Vergleich zu den Revertanten zeigen, ist die Frequenz Latenz-assoziiertes IE1-Transkriptionsereignisse bei der Funktionsverlust-Mutante signifikant erhöht. Damit konnte erstmalig der Beweis für eine Kontrolle der Latenz-assoziierten IE1-Genexpression durch IE1-Epitop-spezifische CD8 T-Zellen und damit für eine Präsentation des IE1-Peptids während der Latenz erbracht werden.

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG.....	I
INHALTSVERZEICHNIS.....	II
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VIII
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Taxonomie der Herpesviren.....	1
1.2 Eigenschaften der Cytomegaloviren.....	2
1.2.1 Virionstruktur.....	2
1.2.2 Genomstruktur.....	3
1.2.3 Genexpression und CMV-Replikation.....	3
1.3 Klinische Relevanz der CMV-Infektion.....	5
1.3.1 mCMV-Infektion der Maus als Modellsystem für eine hCMV-Infektion.....	6
1.4 Kontrolle der CMV-Infektion durch das Immunsystem.....	7
1.4.1 MHC-Klasse-I-Antigenpräsentationsweg.....	9
1.5 Latenz von Cytomegaloviren.....	11
1.5.1 Latenzort von CMV.....	12
1.5.2 Virale Genexpression während der Latenz.....	12
1.5.3 Kontrolle der Latenz durch CD8 T-Zellen.....	14
1.6 CMV-Mutagenese mittels BAC (<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>)-Technologie.....	14
1.6.1 Zielgerichtete Mutagenese eines mCMV-BAC-Plasmids mittels Zwei-Schritt-Rekombinationsverfahren.....	16
1.6.2 Zielgerichtete Mutagenese eines mCMV-BAC-Plasmids mittels Ein-Schritt-Rekombinationsverfahren.....	18
1.7 Zielsetzung.....	19
2 MATERIAL UND METHODEN.....	20
2.1 Allgemeine Laborgeräte und Reagenzien.....	20
2.1.1 Allgemeine Laborgeräte.....	20
2.1.2 Plastikwaren und Verbrauchsmaterialien.....	21
2.1.3 Chemikalien.....	22
2.1.4 Radiochemikalien.....	24
2.1.5 Enzyme.....	24
2.1.6 Antikörper.....	25
2.2 Viren.....	25
2.3 Materialien für die Zellkultur.....	27

2.3.1	Reagenzien und Medienzusätze	27
2.3.2	Zellkulturmedien	29
2.3.3	Primäre Zellen, Zelllinien und Hybridome	29
2.3.4	mCMV-Peptide	30
2.4	Zellkulturmethoden	31
2.4.1	Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen	31
2.4.2	Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität	31
2.4.3	Anlage von Murinen Embryofetalen Fibroblasten.....	32
2.4.4	Transfektion von Säugerzellen mit Dendrimeren.....	33
2.4.4.1	Transfektion von BAC-Plasmid-DNA	33
2.4.4.2	Co-Transfektion von Plasmid-DNA für Dual-Luciferase Reportergeren Assay.....	34
2.4.5	Dual Luciferase Reportergeren (DLR)-Assay	35
2.5	Versuchstiere	35
2.6	Tierexperimentelle Methoden.....	36
2.6.1	Intraplantare Infektion der BALB/c Maus	36
2.6.2	Immunsuppression	36
2.6.3	Organentnahme und Probenkonservierung.....	36
2.7	Virologische Methoden.....	37
2.7.1	mCMV-Produktion	37
2.7.2	mCMV-Titerbestimmung.....	38
2.7.3	Eliminierung von BAC-Sequenzen aus rekombinanten mCMV	39
2.8	Molekularbiologische Materialien	40
2.8.1	Oligonukleotide	40
2.8.1.1	Sequenzier-Oligonukleotide	40
2.8.1.2	PCR-Oligonukleotide	40
2.8.2	Bakterienstämme	44
2.8.3	Vektorsysteme	45
2.9	Molekularbiologische Standardmethoden.....	46
2.9.1	Phenolische DNA-Extraktion.....	46
2.9.2	Präzipitation von Nukleinsäuren.....	46
2.9.3	Quantifizierung von Nukleinsäure-Proben	47
2.9.4	Restriktion.....	48
2.9.5	Native Gelelektrophoresen von DNA	48
2.9.6	Elution von DNA aus Agarose-Gelen.....	50
2.9.7	Reinigung von DNA	50
2.9.8	Dephosphorylierung linearer DNA	50
2.9.9	Herstellung von <i>blunt-ends</i> nach Restriktionsenzymverdau	51
2.9.10	Ligation von DNA-Fragmenten.....	51

2.9.10.1	Ligation von PCR-Fragmenten mit QIAGEN PCR <i>Cloning</i> Kit	52
2.9.11	Bakterienanzucht	52
2.9.11.1	Flüssigkulturen.....	52
2.9.11.2	Plattenkulturen.....	53
2.9.11.3	Dauerkulturen	53
2.9.12	Transformation kompetenter Bakterienzellen	54
2.9.12.1	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien mit der CaCl ₂ -Methode	54
2.9.12.2	Transformation chemisch kompetenter Bakterien	54
2.9.12.3	Herstellung elektrokompenter Bakterien.....	55
2.9.12.4	Elektrotransformation	56
2.10	Isolierung und Analyse von Nukleinsäuren.....	56
2.10.1	Plasmid Minipräparationen.....	56
2.10.1.1	Schnellpräparation von Plasmid-DNA.....	56
2.10.1.2	Schnellpräparation von BAC-DNA (BAC-Minipräparation).....	57
2.10.1.3	QIAprep Spin Miniprep	57
2.10.2	Plasmid-Maxipräparationen.....	58
2.10.2.1	QIAGEN Plasmid-Maxipräparation	58
2.10.2.2	Isolierung von BAC-DNA mit <i>Nucleobond</i> PC 500 (BAC-Maxipräparation).....	58
2.10.3	Isolierung viraler und zellulärer Nukleinsäuren.....	59
2.10.3.1	DNA-Isolierung aus Organen und Geweben	59
2.10.3.2	Isolierung von viraler DNA.....	59
2.10.4	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	60
2.10.4.1	PCR für Klonierungszwecke.....	61
2.10.4.2	Mutagenese durch Kombinations-PCR.....	62
2.10.4.3	Nichtradioaktive PCR-Sequenzierung.....	63
2.10.4.4	Quantitative <i>Real-Time-PCR</i> (qPCR).....	64
2.10.4.4.1	<i>TaqMan</i> PCR	64
2.10.5	Southernblotanalyse	65
2.10.5.1	Transfer von DNA auf feste Träger	65
2.10.5.2	Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden	67
2.10.5.3	Hybridisierung von Nylonmembranen mit radioaktiv markierten DNA-Proben.....	68
2.10.5.4	Detektion radioaktiv markierter Nukleinsäuren	70
2.11	Herstellung rekombinanter mCMV mittels BAC- (<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>) Technologie.....	70
2.11.1	Mutagenese mittels Zwei-Schritt-Rekombinationsverfahren im <i>E. coli</i> Stamm DH10B... 70	
2.11.2	mCMV-BAC-Mutagenese durch das Ein-Schritt- Rekombinationsverfahren im <i>E. coli</i> Stamm DH10B	73

2.11.2.1	Transformation des Plasmids pKD46, Herstellung elektrokompetenter und Arabinose-induzierter Bakterien.....	73
2.11.2.2	Herstellung und Aufreinigung des PCR-Fragments mit viralen Homologien an den Enden	75
2.11.2.3	Transformation des PCR-Fragments in Arabinose-induzierte Bakterien	76
2.11.2.4	Exzision des mit FRT-Sequenzen flankierten Selektionsmarkers.....	77
2.12	Immunologische Methoden	77
2.12.1	<i>ELISpot (Enzyme-linked immuno spot)-Assay</i>	77
2.12.2	Gewinnung von Lymphozyten aus Organen.....	80
2.12.2.1	Milz.....	80
2.12.2.2	Lymphknoten	80
2.12.3	Magnetische Anreicherung CD8-positiver T-Lymphozyten (MACS)	81
2.13	Histologie	82
2.13.1	Vorbereitung der Organe für die histologischen Färbungen	82
2.13.2	mCMV-IE1-Immunhistochemie	83
3	ERGEBNISSE	85
3.1	Generierung von mCMV-Rekombinanten mit Punktmutationen im MHC-Anker Codon	86
3.2	Strategie zur Herstellung rekombinanter mCMV-BAC-Plasmide mittels Zwei-Schritt-Rekombinationsverfahren in <i>E. coli</i>	89
3.2.1	Klonierung rekombinanter <i>Shuttle</i> -Plasmide.....	91
3.2.2	IE1- <i>Shuttle</i> -Plasmide.....	91
3.2.3	m164- <i>Shuttle</i> -Plasmide	95
3.3	Charakterisierung rekombinanter <i>Shuttle</i> -Plasmide	98
3.3.1	Restriktions-Analyse der IE1- <i>Shuttle</i> -Plasmide	98
3.3.2	Restriktions-Analyse der m164- <i>Shuttle</i> -Plasmide	99
3.3.3	Sequenz-Analyse der IE1- <i>Shuttle</i> -Plasmide.....	99
3.3.4	Sequenz-Analyse der m164- <i>Shuttle</i> -Plasmide	101
3.4	Herstellung rekombinanter mCMV-BAC-Plasmide	103
3.4.1	Herstellung rekombinanter mCMV-BAC-IE1-Plasmide	103
3.4.2	Herstellung rekombinanter mCMV-BAC-m164-Plasmide.....	104
3.4.3	Herstellung von Doppelmutante und Doppelrevertante.....	105
3.4.4	Molekulare Charakterisierung der hergestellten mCMV-BAC-Plasmide.....	106
3.4.4.1	Restriktions-Analyse.....	106
3.4.4.2	Sequenz-Analyse.....	109
3.4.5	Herstellung rekombinanter mCMV aus mCMV-BAC-Plasmid-DNA.....	113
3.4.5.1	Exzision der BAC-Sequenzen.....	114

3.5	Etablierung einer quantitativen <i>Real-Time-PCR</i> zur viralen DNA-Bestimmung.....	118
3.5.1	Konstruktion eines Plasmid-Standards	118
3.5.2	qPCR zur absoluten Quantifizierung viraler DNA.....	120
3.6	Bestimmung des Genom-zu-PFU-Verhältnisses	122
3.7	Überprüfung der Funktionalität mutierter IE1-Proteine	124
3.8	<i>In vivo</i> Charakterisierung von mCMV-Rekombinanten.....	127
3.8.1	Quantitative Analyse der Virus-Replikation.....	127
3.8.1.1	Quantifizierung der <i>in vivo</i> -Replikation mittels qPCR	129
3.8.1.2	Quantifizierung der Virus-Replikation durch Immunhistologie der Leber	132
3.9	Immunologische Charakterisierung der MHC-Klasse-I-Anker-Mutanten	136
3.9.1	Funktionelle Verifikation der IE1-Funktionsverlust-Mutante im <i>ELISpot-Assay</i>	136
3.9.2	Untersuchung von mCMV-Peptid-spezifischen T-Zellfrequenzen nach Infektion mit verschiedenen mCMV-Rekombinanten.....	138
3.10	Herstellung rekombinanter mCMV mittels Ein-Schritt-Rekombinationsverfahren	143
3.10.1	HA-Epitop-Markierung des ORF <i>m164</i> -Proteins von mCMV	145
3.10.1.1	Entfernung des Selektionsmarkers nach der Mutagenese.....	148
3.10.2	Charakterisierung der HA-markierten rekombinanten mCMV-BAC-Plasmide.....	149
4	DISKUSSION	152
4.1	Diskussion der Ergebnisse	152
4.2	Fazit und Ausblick	167
5	LITERATURVERZEICHNIS	169
6	ANHANG	183
6.1	Lineare Regression mit Mathematica V4.2.1 Statistik-Software	183
6.2	Konfidenzintervalle und p-Werte aller <i>ELISpot</i> -Daten.....	185
6.2.1	<i>ELISpot</i> -Daten für Kapitel 3.9.1	185
6.2.2	<i>ELISpot</i> -Daten für Kapitel 3.9.2	186
6.3	Plasmidkarten	188
6.3.1	IE1- <i>Shuttle</i> -Plasmide und Zwischenkonstrukte	188
6.3.2	m164- <i>Shuttle</i> -Plasmide und Zwischenkonstrukte.....	190
6.4	<i>Alignments</i>	191
6.5	LightCycler PCR-Profil.....	195
6.6	TaqMan-Analyse zur Berechnung der Genom-zu-PFU-Verhältnisse	196
6.7	Quantifizierung der <i>in vivo</i> -Replikation mittels qPCR	198
6.7.1	Original <i>TaqMan</i> Daten	198
6.7.2	Verdopplungszeiten der mCMV-IE1-Mutanten im Vergleich zu mCMV-BAC-WT	201

7 VERÖFFENTLICHUNGEN	202
-----------------------------------	------------

Abkürzungsverzeichnis

AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	Aminopeptidase
APS	Ammoniumpersulfat
APZ	Antigen präsentierende Zelle
AS	Aminosäure
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	<i>Bacterial artificial chromosome</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
Cam	Chloramphenicol
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	copy DNA
cfu	<i>Colonie forming units</i>
CIP	<i>Calf Intestinal Phosphatase</i>
CMV	Cytomegalovirus
CTL	cytotoxische T-Lymphozyten
CTP	Cytidintriphosphat
d	Tag
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DLR	Dual-Luciferase-Reporter-Assay
DMF	n,n-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribo-Nukleotidtriphosphate
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	<i>Early</i>
EBV	Epstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermis-Wachstumsfaktor-Rezeptor
<i>ELISpot-Assay</i>	<i>Enzyme Linked Immuno Spot-Assay</i>
EM	Effektor-Memory
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAP	ER Aminopeptidase
EtBr	Ethidiumbromid
Ex	Exon
FCS	Fetales Kälberserum
F	Farad
FL	<i>Firefly</i> Luciferase
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
for...	<i>forward</i>
G	<i>Gap</i>
G418	Geneticin
GM	Granulozyten / Monozyten

GTP	Guanosintriphosphat
Gy	Gray
h.....	Stunde
HA.....	Hämagglutinin
HAc.....	Essigsäure
hCMV.....	humanes Cytomegalovirus
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HHV	Humanpathogenes Herpesvirus
H ₂ O _{demin.}	VE-Wasser (Millipore, Molsheim, Frankreich)
H ₂ O _{reinst.}	Reinstwasser (Aqua adiniectabilia, Braun Melsungen)
HSV	Herpes Simplex Virus
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykan
IHC	immunhistochemisch
IFN γ	Interferon gamma
IE	<i>Immediate Early</i>
Ig.....	Immunoglobulin
INM.....	innere Kernmembran (<i>inner nuclear membrane</i>)
KAc.....	Kaliumacetat
Kan	Kanamycin
kbp	Kilobasenpaar
KMT	Knochenmarktransplantation
KSHV.....	Kaposi-Sarkom-assoziiertes Herpesvirus
L.....	<i>Late</i>
LB	Luria-Bertani Medium
LMP	<i>Low Molecular Weight Protein</i>
m.....	Steigung
M.....	Molar
MACS.....	<i>Magnetic Cell Sorting</i>
mCi	milli Curie
mCMV.....	murines Cytomegalovirus
MCS.....	<i>Multiple Cloning Site</i>
ME	β -Mercaptoethanol
MECL.....	<i>Multicatalytic Endopeptidase Complex-Like</i>
MEF	Murine Embryofetale Fibroblasten
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MIE	<i>Major Immediate Early</i>
MIEPE	<i>Major Immediate Early Promotor Enhancer</i>
min.....	Minuten
MOPS.....	2-(N-morpholino)-propansulfonsäure
MPN.....	<i>Most Probable Number</i>
NaAc.....	Natriumacetat
NCS	<i>New born Calf Serum</i>
NEB	<i>New England Biolabs</i>
NIEPs	<i>Non Infectious Enveloped Particles</i>
NK.....	Natürliche Killer-Zellen
OD	Optische Dichte
ONM	äußere Kernmembran (<i>outer nuclear membrane</i>)
ORF	offenes Leseraster (<i>open reading frame</i>)
OT.....	Objektträger

P	Promotor
p.a.	pro Analysis
p.i.	post Infektion
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase-Chain-Reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
PFU	<i>Plaque Forming Units</i>
PLP	Promyeloisches Leukämie Protein
PM	Plasmamembran
pp	Phosphor-Protein
pthrp	<i>murine parathyroid hormone-related peptide-encoding gene</i>
qPCR	quantitative <i>Real-Time</i> -PCR
RecA	Rekombinase A
rev	<i>reverse</i>
Res	Resistenz
RL	Renilla Luciferase
RLU	<i>Relative Luminescence Units</i>
RNR	Ribonukleotid-Reduktase
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur 20-22°C
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
s	Sekunde
SCID	<i>Severe Combined Immunodeficiency-Syndrome</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SP	<i>Shuttle</i> -Plasmid
SPF	<i>Specified Pathogen Free</i>
SSC	Standard Saline Citrate
SV	sekretorische Vesikel (<i>secretory vesicles</i>)
T _{1/2}	Halbwertszeit
T _A	Hybridisierungstemperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAP	Transporter Assoziiert mit Antigen-Prozessierung
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCR	T-Zell Rezeptor
tdy	<i>male sex [testes]-determining gene</i>
TE	Tris-EDTA
TF	Transkriptionsfaktor
TFBS	TF-Bindungsstelle
Tet	Tetracyclin
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
T _m	mittlerer Schmelzpunkt
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TS	Thymidylat Synthase
Tween20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
U	<i>Units</i>
üN	über Nacht
upm	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridintriphosphat
UV	ultraviolette Strahlung
v	<i>volume</i>
Vol.	Volumen
VSP	Virus-Standard-Puffer

VZV.....Varicella Zoster Virus

w.....*weight*

X-Gal5-Bromo-4-chlor-3-indolyl- β -galactosid

ZZZellzahl

ZNSZentrales Nervensystem

ZVTEZentrale Versuchtiereinrichtung

Anmerkung: International übliche Terminologie auf Englisch wurde beibehalten und zur Kennzeichnung *kursiv* gesetzt.

1 Einleitung

1.1 Taxonomie der Herpesviren

Die Familie der *Herpesviridae* ist in der Natur ubiquitär verbreitet und umfasst bisher acht bekannte humanpathogene (siehe Tabelle 1.1) sowie über 100 tierpathogene Erreger. Die Zuordnung einzelner Viren zu den *Herpesviridae* erfolgt in erster Linie aufgrund der charakteristischen einheitlichen Architektur des Viruspartikels (Plummer, 1967; zur Übersicht siehe Roizman et al., 1992) (Abb. 1.1). Allen Herpesviren gemeinsam ist die Fähigkeit zur Etablierung einer lebenslangen Latenz, d. h. nach einer Primärinfektion verbleibt das Virus im Wirtsorganismus (Roizman & Baines, 1991).

Unter-Familie	Genus	Virus	Synonym	Referenz
α - <i>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 et al., 1980
β - <i>Herpesvirinae</i>	Cytomegalovirus	HHV-5	humanes Cytomegalovirus (hCMV)	Smith, 1956
	Roseolovirus	HHV-6		Lindquister & Pellett, 1991;
		HHV-7		Frenkel et al., 1990
γ - <i>Herpesvirinae</i>	Lymphocryptovirus	HHV-4	Epstein-Barr Virus (EBV)	Epstein et al., 1965
	Rhadinovirus	HHV-8	Kaposi-Sarkom-assoziiertes Herpesvirus (KSHV)	Chang et al., 1994

Tab. 1.1 Humanpathogene Herpesviren (HHV) (verändert nach Van Regenmortel et al., 2000)

Die *Herpesviridae* werden aufgrund unterschiedlicher biologischer Eigenschaften, die sich auf das Wirtsspektrum, die Dauer ihres Replikationszyklus sowie die spezielle Zytopathologie und den Ort ihrer Persistenz beziehen, in drei Subfamilien α -, β -, und γ -*Herpesvirinae* eingeteilt (siehe Tabelle 1.1).

α -*Herpesvirinae* zeichnen sich durch ihr breites Wirtsspektrum und einen kurzen Replikationszyklus aus. Diese Viren sind neurotrop und persistieren in sensorischen Ganglienzellen des Wirtes. Hingegen zeigen die β -*Herpesvirinae* eine strikte Spezies- und Zelltypspezifität sowie einen langsamen Replikationszyklus. Auch die γ -*Herpesvirinae* haben ein limitiertes Wirtsspektrum. Zudem besitzen sie die Fähigkeit, T- und B-Lymphozyten zu infizieren und dort zu persistieren (zur Übersicht siehe Roizman & Pellett, 2001).

1.2 Eigenschaften der Cytomegaloviren

Die Cytomegaloviren (humanes: hCMV; murines: mCMV) sind große DNA-Viren mit einer Kodierungskapazität von etwa 165-170 Proteinen, die der Gruppe der β -*Herpesvirinae* zugeordnet werden. Die typische, mit Einschlusskörpern verbundene Vergrößerung der infizierten Zellen (Zytomegalie) war namensgebend für die Gruppe der CMV (Weller et al., 1960).

1.2.1 Virionstruktur

Die Morphologie des CMV-Virions entspricht der aller anderen Vertreter der *Herpesviridae* (siehe Abb. 1.1). Reife CMV-Virionen haben einen Durchmesser von 150 bis 200nm. Ein Virion besteht aus dem linearen DNA-Genom, welches mit fibrillären Proteinen assoziiert vorliegt und vom Nukleokapsid umgeben ist. Das ikosaedrische Nukleokapsid hat einen Durchmesser von etwa 100nm und setzt sich aus 162 Kapsomeren zusammen; es ist von einer amorphen Proteinmatrix, dem Tegument, aus ca. 20 verschiedenen viralen Proteinen umgeben. Das Nukleokapsid wird bei hCMV aus 5 bzw. bei mCMV aus 4 verschiedenen Proteinen gebildet (zur Übersicht siehe Streblow et al., 2005). Nach außen wird das Tegument durch eine Lipidhülle abgegrenzt. Die Hülle des Virus wird durch eine Lipid-Doppelschicht zellulären Ursprungs mit eingebetteten viralen Glykoproteinen (siehe Abb. 1.1) (Mocarski & Courcelle, 2001; zur Übersicht siehe Streblow et al., 2005) gebildet, durch welche die Anheftung der Partikel an die Wirtszelle vermittelt wird.

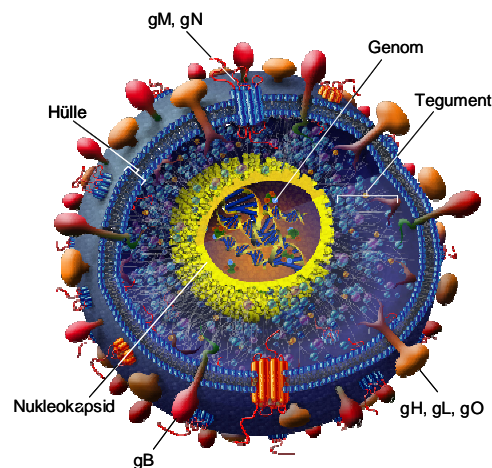


Abb. 1.1 Modell der Struktur eines hCMV Partikels, verändert nach Streblow et al., 2005. Glykoprotein-Komplex I: gB; Glykoprotein-Komplex II: gM, gN; Glykoprotein-Komplex III: gH, gL, gO.

Bei hCMV werden neben den Virionen, die ein vollständiges Nukleokapsid enthalten und infektiös sind, noch weitere Partikeltypen gebildet: nicht infektiöse, umhüllte Partikel (*Non Infectious Enveloped Particles*; NIEPs) und Partikel, die hauptsächlich das virale Tegument-Protein pp65 enthalten (*dense bodies*) (Sarov & Abady, 1975; Irmiere & Gibson, 1983). Beide Partikeltypen besitzen kein virales Genom.

Das mCMV bildet zusätzlich zu Monokapsid-Virionen auch Virionen mit mehreren Nukleokapsiden, so genannte Multikapsid-Virionen, welche in ein Tegument eingebettet und von einer Lipidmembran umhüllt sind. Während in infizierten Drüsenepithel-Zellen der Speicheldrüse ausschließlich Monokapsid-Virionen gebildet werden, finden sich in permissiven Zellen anderer infizierter Organe sowie in *in vitro* infizierten Fibroblasten auch Multikapsid-Virionen (Chong & Mims, 1981; Weiland et al., 1986; Jonjic et al., 1989). Je nach Anzahl der enthaltenen Nukleokapside kann der Durchmesser eines umhüllten Multikapsid-Virions bis zu 600nm betragen. *Dense bodies* konnten bei mCMV nicht beobachtet werden.

1.2.2 Genomstruktur

Das hCMV und das mCMV zählen mit ihren über 230kbp langen linearen DNA-Genomen zu den größten und komplexesten Genomen der Säugetier-infizierenden Viren (Davison et al., 2003). Die Bedeutung der Mehrzahl der 170 offenen Leserahmen (ORFs) bei mCMV und der nach neueren Analysen etwa 167 ORFs bei hCMV (Dolan et al., 2004) ist allerdings immer noch unbekannt (Chee et al., 1990; Cha et al., 1996; Rawlinson et al., 1996; Murphy et al., 2003a). Die Cytomegaloviren der verschiedenen Spezies weisen Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede bezüglich ihrer Genomorganisation auf. Die Genome der Cytomegaloviren sind kolinear, d. h. Homologien zwischen den Genen beziehen sich sowohl auf Sequenz-Ähnlichkeiten als auch auf deren Position innerhalb des Genoms (zur Übersicht siehe Landolfo et al., 2003). Die Größe des Genoms variiert von ca. 190kbp beim equinen CMV bis zu 240kbp beim CMV des Meerschweinchens.

1.2.3 Genexpression und CMV-Replikation

Die Infektion einer Zelle beginnt mit der Adsorption des Virus an die Zelloberfläche und anschließender Fusion der Virushülle mit der Plasmamembran (Compton et al., 1993). Nach dem derzeitigen Kenntnisstand erfolgt zunächst eine Anheftung (*Attachment*) des Virus an den primären Rezeptor Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG) auf der Zellmembran der Wirtszelle (Compton et al., 1993; Boyle & Compton, 1998). Für diese Bindung 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). Weitere Interaktionen zwischen viralen Glykoproteinen der Hülle, insbesondere von gB, mit zellulären Integrinen (Feire et al., 2004) führen zu einer multiplen Heterodimerisierung der zellulären Rezeptoren, sodass schließlich durch eine dieser Interaktionen die Fusion der Virushülle mit der Zellmembran induziert wird und das vom Tegument umgebene Nukleokapsid direkt in das Zytoplasma der Zielzelle gelangt (*Penetration*) (zur Übersicht siehe Boehme & Compton, 2005). Es

wird angenommen, dass die Nukleokapside nach Entfernung des Teguments (*Uncoating*) analog zu HSV-1 durch Dynein-vermittelten Transport entlang der Mikrotubuli zur Kernpore transportiert werden (Sodeik et al., 1997). Nach Bindung der Nukleokapside an den Kernporenkomplex wird die virale DNA ins Nukleoplasma abgegeben (Ojala et al., 2000), zirkularisiert und liegt somit in episomaler Form vor (Marks & Spector, 1988). Im Kern erfolgt die Genexpression und Replikation des CMV-Genoms.

Wie bei allen Herpesviren ist die Genexpression der CMV während der Infektion kaskadenartig reguliert. Dabei treten zeitlich koordiniert drei aufeinander folgende Phasen auf, in denen jeweils bestimmte Gene exprimiert werden: Die *Immediate Early* (IE)-, *Early* (E)- und *Late* (L)-Phase. (Honess & Roizman, 1974; Emery & Griffiths, 1990; Übersichtsartikel: Mocarski & Courcelle, 2001).

Die IE-Phase beginnt unmittelbar nach Erreichen des Zellkerns. Für die Transkription der IE-Gene ist keine *de novo*-Synthese viraler Proteine erforderlich. Es kommt zu einer Interaktion von zellulären Transkriptionsfaktoren mit dem *Major Immediate Early Promotor Enhancer* (MIEPE), einer regulatorischen DNA-Sequenz der IE-Gene. Dies führt zur Transkriptionsinitiation von IE-Genen, nämlich der Gene *ie1*, *ie2* und *ie3* bei mCMV und der Gene *ie1* und *ie2* (entspricht dem *ie3* des mCMV) des hCMV. Die IE-Genprodukte übernehmen eine regulatorische Funktion für die koordinierte Expression der E-Gene (Keil et al., 1984; Bühler et al., 1990; Messerle et al., 1992). Die Aktivierung der E-Gene leitet in Fibroblasten ca. zwei Stunden nach Beginn der Infektion in die E-Phase der viralen mCMV-Genexpression über. E-Proteine werden unter anderem für die Replikation des viralen Genoms benötigt, wie z.B. die virale DNA-Polymerase (Roizman & Batterson, 1986). Die L-Phase beginnt mit der DNA-Replikation. Synthetisierte Proteine dieser Phase gehören überwiegend zu den Strukturproteinen, den späteren Bestandteilen der reifen Virionen.

Die DNA-Replikation erfolgt vom zirkularisierten Genom aus nach dem Prinzip des *rolling circle*. Dabei ist die neusynthetisierte DNA kovalent mit dem Ausgangsmaterial verbunden, wodurch Konkatemere entstehen, die viele Kopien der viralen DNA an einem Stück enthalten. Zur Verpackung der DNA in Nukleokapside werden die Konkatemere an den Genomenden gespalten und somit wieder in lineare Einzel-Genome überführt (Marks & Spector, 1988). Die Morphogenese der Virionen beginnt mit dem Zusammenbau der Nukleokapside in definierten Regionen des Kerns. Der Transport der Kapside durch die Kernmembran startet mit der fokalen Auflösung der nukleären Laminastrukturen. Die Kapside gelangen durch einen als ersten Knospungsprozess (*Budding; primary envelopment*) bezeichneten Vorgang durch die innere Kernmembran (INM) in den perinukleären Raum, wobei sie möglicherweise durch Vermittlung viraler Glykoproteine (Radsak et al., 1990) von der INM umhüllt werden. Diese temporäre Lipidhülle fusioniert anschließend mit der äußeren Kernmembran (ONM) und setzt die nackten Nukleokapside ins Zytoplasma frei. Die endgültige Umhüllung der Kapside findet vermutlich an Membranen des tubulären Endosoms oder des Trans-Golgi-Netzwerks (TGN) statt (Tooze et al., 1993; Fraile-

Ramos et al., 2002). Diese zweite Knospung (*secondary envelopment*), die so genannte Reifungsknospung resultiert in Virionen mit doppelter Hüllmembran. Die äußere dieser Hüllen fusioniert im letzten Schritt der Exozytose mit der Plasmamembran, so dass reife, einfach umhüllte Virionen aus der Zelle freigesetzt werden (zur Übersicht siehe Eickmann et al., 2005; sowie Abb. 1.2).

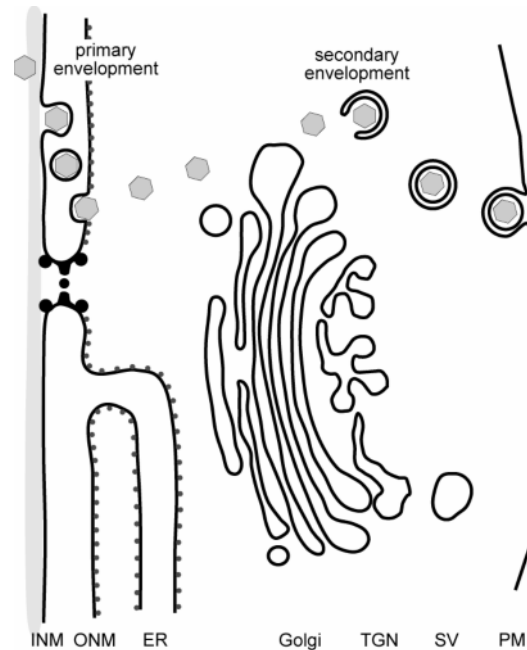


Abb. 1.2 Primary und secondary envelopment während der Virus-Morphogenese. INM, innere Kernmembran; ONM, äußere Kernmembran; ER, endoplasmatisches Retikulum; TGN, Trans-Golgi-Netzwerk; SV, sekretorische Vesikel; PM, Plasmamembran (verändert nach Eickmann et al., 2005).

1.3 Klinische Relevanz der CMV-Infektion

Die Übertragung von hCMV erfolgt meist durch direkten Körperkontakt über Tröpfchen- und Schmierinfektionen. Bei einer frischen Infektion oder Reaktivierung müssen Körperflüssigkeiten wie Speichel, Sperma, Zervixsekret, Muttermilch, Urin und Blut als infektiös angesehen werden. Zudem kann hCMV auch diaplazentar während der Schwangerschaft übertragen werden. Die Prävalenz ist abhängig vom Lebensalter und von sozioökonomischen Bedingungen, welche die CMV Übertragung begünstigen. Sie erreicht in Mitteleuropa und Nordamerika bei Erwachsenen ca. 50%. In Entwicklungsländern wird hingegen bereits im Kindesalter eine Prävalenz von bis zu 100% erreicht (zusammengefasst in Pass, 2001).

Nach der Primärinfektion persistiert das hCMV, ähnlich den übrigen Herpesviren, lebenslang latent im Organismus, wobei die Latenz durch Reaktivierung unterbrochen werden kann. Die postnatale Infektion verläuft meist inapparent, in seltenen Fällen mit Symptomen ähnlich einer infektiösen Mononukleose Erkrankung (Kaariainen et al., 1966). Ausschlaggebend für den klinischen Verlauf

ist der Zeitpunkt der Infektion sowie der Immunstatus des Infizierten. Bei immunkompetenten Personen verläuft die Primärinfektion meist asymptomatisch, während es bei immunsupprimierten Personen zu schweren klinischen Manifestationen der CMV-Infektion kommt. Eine CMV-Infektion ist somit an die immunologische Unreife oder an den Zustand der Immundefizienz gekoppelt. Es können verschiedene Hauptrisiko-Kollektive unterschieden werden:

I. Kongenitale-Infektion des Embryos oder Föten, als Folge einer Primärinfektion der Schwangeren mit hCMV führt aufgrund des noch unausgereiften Immunsystems zu einer Replikation des Virus in verschiedenen Organen und damit einhergehend, zu schweren Embryopathien. Bei Neugeborenen kann es zu Missbildungen des zentralen Nervensystems, Hörschädigung, Hepatosplenomegalien und Thrombozytopenien kommen (Boppana et al., 1992, 1997). Ferner können Spätschäden wie Taubheit und Entwicklungsstörungen, die erst im Kleinkindalter zu Tage treten, beobachtet werden (Fowler et al., 1997; Dahle et al., 2000). Eine rekurrente Infektion einer Schwangeren (Hanshaw & Dudgeon, 1978; Stangow & Whitely, 1985) führt dagegen seltener zu schweren Schäden (Stagno et al., 1982; Yow, 1989), da die Dissimination des Virus durch vorhandene antivirale Antikörper der Mutter reduziert wird.

II. Ein hohes Risiko für rekurrente Infektionen stellen therapiebedingte immunsuppressive Behandlungen dar (Dowling et al., 1976; Neimann et al., 1977; Meyers et al., 1985; Singh et al., 1988). Medikamentöse Immunsuppression wird beispielsweise bei Empfängern von Transplantationen solider Organe zur Prophylaxe einer *Host-versus-Graft* Reaktion angewendet (Ljungman et al., 1993). Zur Entfernung leukämischer Zellen bei Empfängern einer Knochenmarktransplantation (KMT) erfolgt eine starke Immunsuppression im Zuge einer hämatoablativen Behandlung. Empfänger einer allogenen KMT sind diesbezüglich im besonderen Maße gefährdet. Diese Patienten erhalten zur Prophylaxe einer *Graft-versus-Host* Reaktion eine über einen längeren Zeitraum durchgeführte immunsuppressive Therapie (Zaia & Forman, 1995). Primärinfektionen des Empfängers nach Transplantationen als Folge einer Reaktivierung des Virus im Transplantat zeichnen sich in der Regel durch schwere klinische Symptome wie Hepatitiden oder Pneumonien aus und können lebensbedrohlich sein (Britt & Alford, 1996; Reinke et al., 1999).

III. Ein vergleichbares Krankheitsbild wie nach immunsuppressiver Therapie findet sich auch bei einem Patientenkollektiv mit genetisch bedingter Immunschwäche, wie z. B. dem *severe combined immunodeficiency* (SCID)-Syndrom bzw. mit erworbenem Immundefizienz-Syndrom (AIDS). Bei etwa 80% aller AIDS-Patienten erfolgt eine hCMV Primärinfektion oder Reaktivierung (Moskowitz et al., 1985). Dabei stehen Infektionen der Retina, des Gastrointestinaltrakts, der Lunge sowie des ZNS im Vordergrund (Drew, 1992).

1.3.1 mCMV-Infektion der Maus als Modellsystem für eine hCMV-Infektion

Cytomegaloviren sind hochadaptierte Infektionserreger. Aufgrund ihrer strikten Speziespezifität kann die Pathogenese der hCMV-Erkrankung nicht in einem Tiermodell untersucht werden. Die

hohe klinische Relevanz der CMV-Infektion, besonders bei immunsupprimierten Patienten, machte deshalb die Entwicklung von Infektionsmodellen erforderlich. Als zweckmäßige Infektionssysteme zur Untersuchung von Proteinfunktionen sowie der Immunkontrolle und Latenz von CMV haben sich Nagermodele erwiesen. Inzuchtstämme sind verfügbar und die Tiere können unter kontrollierten Bedingungen gezüchtet werden. Am besten untersucht ist die Infektion der Maus mit mCMV. hCMV und mCMV weisen deutliche Analogien bezüglich Pathogenese, Organtropismus, Immunkontrolle sowie Symptomatik nach immunsuppressiver Therapie auf. So konnte beispielsweise die Bedeutung der zellvermittelten Immunität für die Kontrolle einer CMV-Infektion im Maus-Modellsystem eindrucksvoll nachgewiesen werden (Koszinowski et al., 1993). Durch vollständige Auslöschung der zellulären Komponenten des Immunsystems nach γ -Bestrahlung kommt es zu einer schweren zytopathischen Infektion lebenswichtiger Organe, wie Lunge, Leber, Niere, Nebenniere und des Gastrointestinaltrakts (Reddehase et al., 1985; Podlech et al., 1998). Die Heterogenität der Immunantwort bei CMV-Infektionen des Menschen spiegelt sich auch in den genetisch bedingten Unterschieden verschiedener Maus-Inzuchtstämme bezüglich ihrer Suszeptibilität gegenüber mCMV wieder. Aufgrund dieser Charakteristika erweist sich die CMV-Infektion der Maus als exzellentes Modellsystem zur Erforschung der CMV-Infektion des Menschen (Reddehase, 2000; Webb et al., 2002). Unterstützt durch die Herstellung von mCMV-Mutanten und deren Untersuchung im Maus-Modellsystem ist somit die Identifizierung von bisher unbekanntem Genfunktionen für die Pathogenese einer CMV-Infektion möglich.

1.4 Kontrolle der CMV-Infektion durch das Immunsystem

Eine Primärinfektion mit CMV wird in einem immunkompetenten Organismus normalerweise durch das Immunsystem effektiv kontrolliert. Diese Protektion beruht auf unterschiedlichen immunologischen Mechanismen und wird sowohl von Komponenten der angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems kontrolliert. Natürliche Killer (NK)-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der genetisch determinierten „natürlichen Immunität“ gegen CMV-Infektionen sowie generell in frühen viralen Infektionsphasen (Bukowski et al., 1984; Daniels et al., 2001; Arase et al., 2002; zur Übersicht siehe Jonjic et al., 2005). Sie repräsentieren eine primäre Verteidigungslinie, deren Bedeutung innerhalb der ersten drei Tage nach der Infektion am größten ist, da die adaptive Immunantwort durch spezifische Effektor-Zellen einige Tage benötigt, um hinreichend aktiviert zu werden. Ein dauerhafter Schutz kann durch NK-Zellen jedoch nicht vermittelt werden. Nach etwa drei Tagen nimmt die Relevanz der spezifischen T-Zellantwort für die Verteidigung gegen virale Infektion signifikant zu und erreicht um Tag 10 p.i. ihr Maximum (Quinnan et al., 1978).

Die immunologische Kontrolle zur Überwindung einer CMV-Infektion wird in erster Linie von T-Zellen übernommen und stellt eine hochspezifische Funktion des Immunsystems dar. Die Effektorzellen erkennen ein fremdes Antigen, das von einer Antigen-präsentierenden Zelle als prozessiertes Peptid auf einem MHC-Molekül präsentiert wird. Eine spezifische Erkennung des MHC-Peptid-Komplexes auf der Oberfläche infizierter Zellen erfolgt über den T-Zell Rezeptor (TCR) auf der Oberfläche der Effektor-Zelle (Marrack & Kappler, 1987). Während der Reifung der Vorläuferzellen zur thymischen T-Zelle erfolgt eine Reorganisation der variablen Gensegmente, welche für die beiden Ketten des TCR codieren. So entsteht eine Vielzahl von T-Zellen, die jeweils einen TCR mit individueller Spezifität tragen (zur Übersicht siehe Sakaguchi, 2000). Durch Selektion im Thymus wird sichergestellt, dass cytotoxische T-Lymphozyten (CTL), die gegen Selbstantigene gerichtet sind, vor ihrer Reifung eliminiert werden (Hengartner et al., 1988).

Reife T-Lymphozyten in der Peripherie lassen sich in zwei Subpopulationen unterteilen, in CD4 und CD8 T-Zellen. Neben der unterschiedlichen Expression von Zelloberflächen-Molekülen sind CD4 und CD8 T-Zellen auch funktionell voneinander abgegrenzt. Während CD4 T-Zellen nach Erkennung ihrer Antigene überwiegend durch Sekretion von Zytokinen zur Regulierung und Modellierung der Immunantwort beitragen (Germain et al., 1994), können CD8 T-Zellen dagegen nach Antigenkontakt zu CTL differenzieren und die infizierte Zelle abtöten. Nach beendeter Immunantwort überdauert ein Teil der Virus-spezifischen T-Zellen als Gedächtniszellen im Organismus. Damit wird bei erneutem Antigenkontakt, induziert durch eine erneute Infektion oder Virus-Rekurrenz, eine schnelle Immunantwort sichergestellt.

Die vorrangige Stellung der adaptiven Immunität durch CD8 T-Zellen für die Kontrolle einer CMV-Infektion konnte mehrfach bestätigt werden (Quinnan et al., 1978; Reddehase et al., 1985, 1987). Auch in klinischen Studien konnte die herausragende Rolle von CD8 T-Zellen für die Immunkontrolle bei KMT-Patienten bestätigt werden. So korreliert die Kontrolle einer hCMV-Infektion mit der Rekonstitution der CD8 T-Zellen (Reusser et al., 1991). Entsprechend zeigen Zytoimmuntherapie-Studien beim Menschen, dass ein Transfer antiviraler T-Zellklone die Inzidenz der CMV-Erkrankung nach KMT reduziert (Riddel et al., 1992; Walter et al., 1995). In genetisch suszeptiblen Mausstämmen konnte zudem gezeigt werden, dass CD8 T-Zellen aus akut und latent infizierten, immunkompetenten Individuen alleine ausreichend sind, um nach adoptivem Zelltransfer eine ansonsten letale mCMV-Infektion in immunsupprimierten Rezipienten zu verhindern (Reddehase et al., 1985, 1988, Steffens et al., 1998).

Die Immundominanz eines über MHC-Klasse-I präsentierten antigenen Peptids, das aus dem frühen regulatorischen IE1-Protein (pp76/89; Keil et al., 1985) prozessiert wird, konnte für den MHC Haplotyp *H-2^d* (BALB/c) nach genauer Analyse der CD8 T-Zellen nachgewiesen werden (Reddehase & Koszinowski, 1984, Reddehase et al., 1989). In neueren Arbeiten von Holtappels und Kollegen konnte ein weiteres, kodominantes antigenes Peptid aus dem ORF*m164* Protein identifiziert werden (Holtappels et al., 2002c). Für CD8 T-Zelllinien beider Spezifitäten wurde in

einem adoptiven Transfermodell *in vivo* der Beweis erbracht, dass diese vor einem letalen Infektionsverlauf schützen (Reddehase et al., 1988; Holtappels et al., 2002c).

Neben der zellulären Immunantwort spielt in der Phase der Primärinfektion die humorale Immunität durch Antikörper eine sekundäre Rolle. Dennoch konnte an Untersuchungen im Tiermodell gezeigt werden, dass im Falle einer CMV-Rekurrenz, z. B. nach Immunsuppression durch γ -Bestrahlung, CMV-spezifische Antikörper die Virusdissimination im seropositiven Organismus verhindern, so dass die CMV-Infektion fokal bleibt (Reddehase et al., 1994).

1.4.1 MHC-Klasse-I-Antigenpräsentationsweg

Schon in der frühen Evolution der Vertebraten entwickelte sich die Fähigkeit zur Synthese und Erkennung von MHC-Molekülen. MHC-Klasse-I-Moleküle binden viele verschiedene Peptide, die aus einer großen Vielzahl an zellulären Proteinen generiert werden. Die mit Peptid-beladenen MHC-Klasse-I-Moleküle werden zur Zelloberfläche transportiert und dort dem Immunsystem präsentiert. Dieser Prozess ermöglicht CD8 T-Zellen die Identifizierung und Eliminierung von Zellen, welche abnormale oder fremde Proteine synthetisieren, die durch Mutationen zellulärer Gene oder Virus-Infektionen entstehen können. Damit wird die Regulation zellulärer Prozesse sowie die Adaptation an veränderte Bedingungen gewährleistet (zur Übersicht siehe Rock et al., 2002; 2004). MHC-Klasse-I-Moleküle sind in der Lage ein großes Repertoire an Peptiden zu präsentieren, da die starke Interaktion ihrer Peptid-Binde-Furche nur mit wenigen Aminosäure-Seitenketten der Peptide erfolgt (Rammensee, 1995).

Die Degradation der meisten zellulären Proteine (siehe Abb. 1.3) erfolgt über den Ubiquitin-Proteasom-Weg (Goldberg, 2003). Der initiale Schritt in diesem Prozess ist die Konjugation des Polypeptid-Kofaktors Ubiquitin an die ϵ -Aminogruppe von Lysinen im Proteinsubstrat. Eine Kette von 4 oder mehr Ubiquitin Molekülen dient als molekularer „tag“ und markiert die Proteine für eine schnelle Degradation im 26S-Proteasom. Dieses fungiert als multikatalytische Protease mit drei unterschiedlichen Peptidase-Aktivitäten. Die Hydrolyse kann nach großen hydrophoben Resten (*chymotrypsin-like*), nach basischen Resten (*trypsin-like*) oder sauren Resten (*post-acidic* oder *caspase-like*) erfolgen.

Als weitere Proteasomenuntereinheiten konnten LMP (*low molecular weight protein*) 2 und 7 sowie MECL1 (*multicatalytic endopeptidase complex-like* 1) identifiziert werden. Diese Untereinheiten werden nur in lymphatischem Gewebe konstitutiv exprimiert, wohingegen in anderen Zellen die Expression fakultativ ist und durch IFN- γ induziert wird. Nach der Expression werden die IFN- γ -induzierbaren Untereinheiten kooperativ in sich neu assemblierende Proteasomen eingebaut und ersetzen damit ihre konstitutiv exprimierten Gegenstücke. Derartig modifizierte Proteasomen werden als Immunproteasomen bezeichnet und besitzen veränderte proteolytische Eigenschaften und Spaltungsraten (zur Übersicht siehe Kloetzel, 2004).

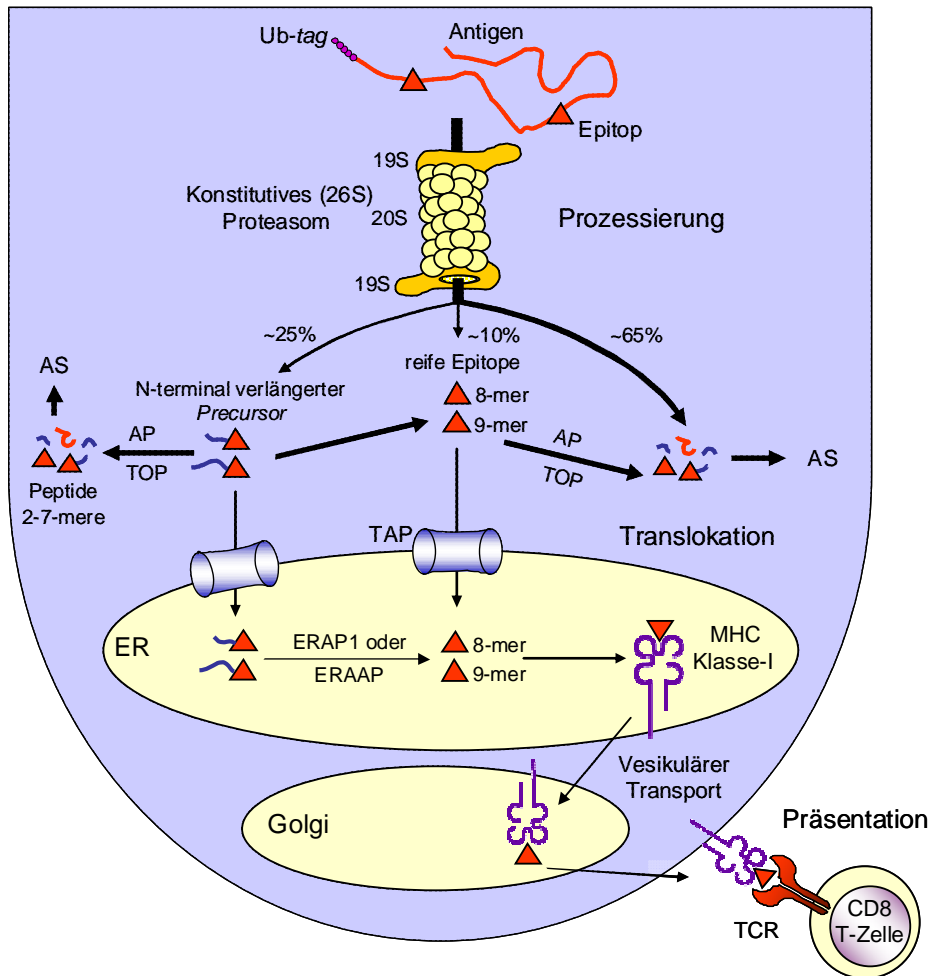


Abb. 1.3 Schematische Darstellung des MHC-Klasse-I-Antigenpräsentationsweges. Multi-ubiquitinierte Proteine (Antigene) werden im Zytosol durch das Proteasom degradiert. Die daraus resultierenden Peptide können durch Amino- und Endopeptidasen zu freien Aminosäuren degradiert werden. Einige reife Epitope entkommen der Zerstörung im Zytosol und werden über den TAP-Komplex in das ER Lumen transportiert. Dort können sie durch ER Amino- und Endopeptidasen: ERAP1 (human; York et al., 2002; Saric et al., 2002) oder ERAAP (murin; Serwold et al., 2002) degradiert werden oder der weiteren Zerstörung durch Bindung an ein MHC-Klasse-I-Molekül entgehen. Ubiquitin (Ub); Aminosäuren (AS); Aminopeptidase (AP); Thimet-Oligopeptidase (TOP; Saric et al., 2001); ER, Endoplasmatisches Retikulum; TCR, T-Zellrezeptor; rote Dreiecke, AS-Sequenz die an ein MHC-Klasse-I-Molekül bindet; blaue Linien, AS-Sequenzen die vor der Bindung an MHC-Klasse-I-Moleküle entfernt werden müssen (verändert nach Reddehase et al., 2002; und Rock et al., 2004).

Die vom Proteasom generierten Peptide bestehen überwiegend aus 2- bis 7-meren, die nicht an MHC-Moleküle binden können und sehr schnell im Zytosol durch Amino- und Endopeptidasen zu freien Aminosäuren abgebaut werden. Neben reifen Epitopen (8- bis 11-meren; Chang et al., 2005) die nach TAP- (Transporter assoziiert mit Antigen-Prozessierung) vermitteltem Transport in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) direkt an MHC-Klasse-I-Moleküle binden können, entstehen am Proteasom auch N-terminal verlängerte *Precursor*-Moleküle, die vor ihrer Bindung an MHC-Klasse-I-Moleküle noch N-terminal getrimmt werden müssen (siehe Abb. 1.3). Der TAP-Komplex transportiert Peptide mit einer Länge von 7 bis über 20 Aminosäuren und ist somit in der

Lage sowohl reife Epitope als auch längere *Precursor*-Moleküle zu transportieren (Momburg et al., 1994). Neben der Länge der *Precursor*-Moleküle, ist für einen effizienten Transport am TAP die Aminosäuresequenz sowie besonders die Position bestimmter Aminosäuren, in den zu transportierenden *Precursor*-Molekülen, von Bedeutung; z. B. behindert die Aminosäure Prolin an Position 2 des reifen IE1-9-mers YPHFMPTNL den Transport am TAP, wohingegen das Prolin an Position 4 im putativen *Precursor*-Molekül DMYPHFMPNTL keinen Einfluss auf die Translokation in das ER Lumen zeigt (Kneuhl et al., 2001).

Im ER binden reife Epitope, unterstützt von verschiedenen Chaperonen, an sich assemblierende MHC-Klasse-I-Moleküle, die anschließend in einem vesikulären Transport über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert werden. Dort ist der mit Peptid-beladene MHC-Klasse-I-Komplex für einige Stunden stabil und kann durch CD8 T-Zellen mit entsprechendem TCR erkannt werden (siehe Abb. 1.3) (zur Übersicht siehe Rock et al., 2004).

1.5 Latenz von Cytomegaloviren

Nach der für *α -Herpesvirinae* aufgestellten Definition von Roizman & Sears (1987) versteht man unter Latenz das Überdauern des viralen Genoms in einem nicht-replikativen Zustand, aus dem heraus aber Reaktivierung zu rekurrenter Infektion erfolgen kann. Für CMVs, Vertreter der *β -Herpesvirinae*, war die Existenz einer molekularen Latenz jedoch lange umstritten. Es wurde postuliert, dass CMVs während der Latenz auf einem Niveau unterhalb der Nachweisgrenze der zur Verfügung stehenden Infektivitätstests replizieren. Für hCMV wurde der Virusnachweis in gesunden Personen als Beleg für Persistenz (persistierende Replikation) angesehen, obwohl es sich dabei auch um intermittierende Rekurrenz handeln könnte. Nach der Hypothese der Persistenz wäre eine Reaktivierung nicht das Resultat einer durch Transkriptionsfaktor-induzierende Signale eingeleiteten Änderung der viralen Genexpression, sondern es sollte allein der Entzug der Immunkontrolle zu einer Steigerung der Virus-Replikation und somit zur messbaren Rekurrenz führen. In diesem Sinne wurde Rekurrenz von mCMV nach Depletion von lymphoiden Zellpopulationen (CD8 T-Zellen, CD4 T-Zellen, NK-Zellen) interpretiert (Polic et al., 1998). Bei dieser Interpretation wurde nicht berücksichtigt, dass eine *in vivo* Depletion von Zellpopulationen auch die Freisetzung von Zytokinen induziert, die über Signalkaskaden zur Aktivierung des latenten viralen Genoms führen können. Auch die Interpretation des Nachweises von Transkripten des IE-Gens *ie1* während der Viruslatenz als Beweis für eine persistierende produktive Infektion (Yuhasz et al., 1994) und die Annahme, IE1-Transkripte als Marker für den produktiven replikativen Zyklus anzusehen, haben sich als falsch erwiesen. Durch Methoden, mit denen die Sensitivität des Nachweises von replikativem Virus wesentlich erhöht wurde, konnte das Vorliegen einer Persistenz für den mCMV-Stamm Smith ausgeschlossen werden (Kurz et al., 1997).

1.5.1 Latenzort von CMV

Die zellulären Orte der CMV-Latenz sind bis jetzt nicht eindeutig bestimmt. Für hCMV konnten virales Genom und Latenz-assoziierte virale Transkripte in einer geringen Anzahl hämatopoetischer Zellen der myelomonozytären Differenzierungsreihe gefunden werden (Kondo et al., 1994; Hahn et al., 1998; zur Übersicht siehe Streblov und Nelson, 2003; Mocarski et al., 2005). Demnach könnte das latente virale Genom durch klonale Expansion von Granulozyten/Monozyten (GM)-Progenitoren im Knochenmark vermehrt und über die Ausschleusung von Monozyten dissiminiert werden. Auch für mCMV gelang der Nachweis des viralen Genoms in myelomonozytären Zellen (Pollock et al., 1997). Da reife Makrophagen und Dendritische-Zellen ebenfalls permissiv für eine produktive CMV-Infektion sind, kommen diese auch als zelluläre Orte der Virusreaktivierung in Betracht. Longitudinale Analysen für mCMV zeigten allerdings 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 & Reddehase, 1999; zur Übersicht siehe Reddehase et al., 2002). Für hCMV stehen analoge Untersuchungen noch aus. 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, Herz) vorhandener Zelltyp sein muss (Reddehase et al., 1994). Als mögliche Kandidaten können endotheliale Zellen (Mercer et al., 1988; Koffron et al., 1998) und/oder langlebige, gewebsständige Makrophagen/Histiozyten (Koffron et al., 1998) angesehen werden. So ist die Lunge gemessen an ihrer Genomlast (ca. 2000 bis 5000 latente Genome pro 10^6 Lungenzellen) ein Hauptort der mCMV Latenz (Balthesen et al., 1993; Kurz et al., 1997; Kurz & Reddehase, 1999; Grzimek et al., 2001; Simon et al., 2005a).

1.5.2 Virale Genexpression während der Latenz

In hämatopoetischen Progenitoren der myelomonozytären Differenzierungsreihe konnte für hCMV die Existenz von *Sense*- und *Antisense*-Transkripten aus der *Major Immediate Early* (MIE) Genregion nachgewiesen werden (Kondo et al., 1996). Die Latenz-assoziierten *Sense*-Transkripte unterscheiden sich von den IE1/2-Transkripten der produktiven Phase durch Nutzung alternativer *Transcription Start Sites*. Nur eines von 4 *Sense*-Transkripten (ORF94) wurde näher analysiert und erwies sich als nicht essentiell für produktive oder latente Infektion (White et al., 2000). Selbst nach Infektion von GM-Progenitoren in Zellkultur exprimierten während der nachfolgenden Latenz nur wenige der Virus-DNA positiven Zellen die Latenz-assoziierten Transkripte (Slobedman & Mocarski, 1999). Diese sind somit nicht Latenz-assoziiert im strengeren Sinne, sondern werden nur gelegentlich transkribiert (Variegation). Über die Bedeutung dieser Transkriptionsereignisse für Etablierung oder Aufrechterhaltung von Latenz ist bisher nichts bekannt. Ein Problem der hCMV Latenz-Forschung ist das Fehlen eines *in vivo*-Modells zur experimentellen Untersuchung der Latenz in Organen.

Bei mCMV konnten Latenz-assoziierte Transkripte aus der MIE-Genregion in der Lunge nachgewiesen werden (Kurz & Reddehase, 1999; Kurz et al., 1999; Grzimek et al., 2001). In der Lunge liegt nur ein geringer Anteil latenter mCMV-Genome im Bereich des MIE-Locus spontan „desilenced“ vor, sodass die MIE-Gene *ie1* und *ie2* exprimiert werden können. Der Zustand der Latenz bleibt weiterhin bestehen, weil das differentielle *Splicing* des primären IE1/3-Transkripts zum Transaktivator-Transkript-IE3 nicht erfolgt. Zur besseren Übersicht zeigt Abb. 1.4 die Organisation der MIE-Genregion von mCMV.

Der MIE-Enhancer ist essentiell für die *in vitro*- und *in vivo*-Replikation (Ghazal et al., 2003). 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). Aus dem IE2-Transkript entsteht das IE2-Protein (Exon 3). Das IE1-Protein ist nicht essentiell für Replikation in Zellkultur, ist aber wesentlich für effiziente *in vivo*-Replikation in ruhenden Zellen und damit für die *in vivo*-Virulenz (Ghazal et al., 2005).

IE3 ist der essentielle Transaktivator für die E-Genexpression und damit essentiell für den produktiven Zyklus (Angulo et al., 2000). Das IE1-Protein enthält das im Haplotyp *H-2^d* immundominante IE1-Peptid. Die Funktion von IE2 ist unbekannt; für die Virus-Replikation ist es weder *in vitro* noch *in vivo* essentiell und auch für die Etablierung von Latenz verzichtbar (Cardin et al., 1995).

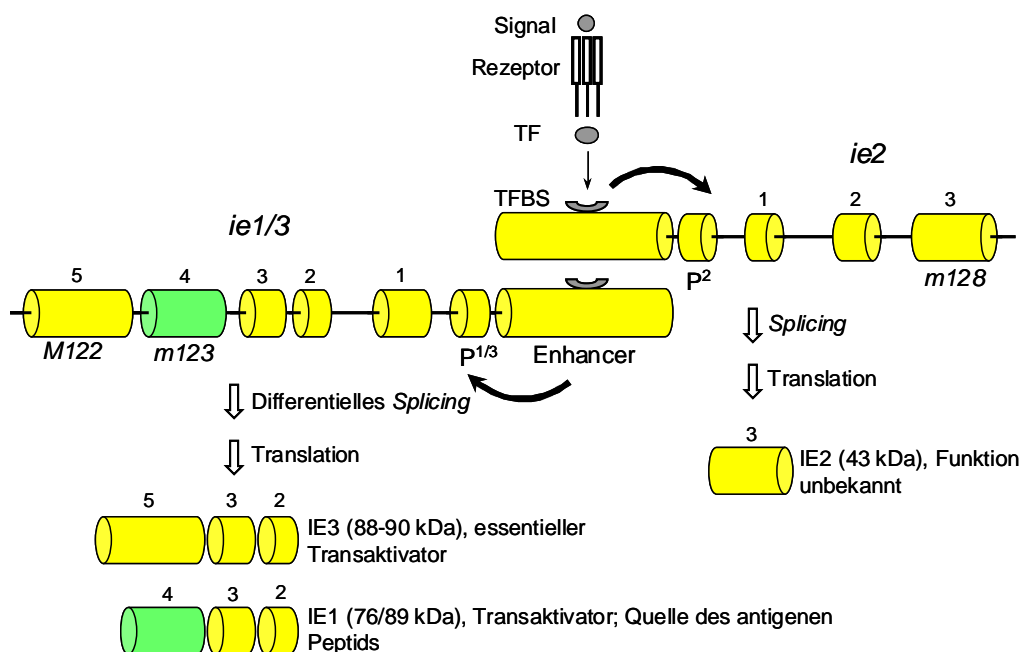


Abb. 1.4 Genomische Organisation der MIE-Region von mCMV. Der MIE-Enhancer steuert die Expression der *ie1/3*-Transkriptionseinheit (ORFs *m123* und *M122*) und in Gegenrichtung des *ie2*-Gens (ORF *m128*), die jeweils einen spezifischen Promotor ($P^{1/3}$, P^2) besitzen (Dorsch-Häsler et al., 1985; Keil et al., 1987; Messerle et al., 1991, 1992;). TF, Transkriptionsfaktor; TFBS, Transkriptionsfaktor-Bindungsstelle.

1.5.3 Kontrolle der Latenz durch CD8 T-Zellen

Die *in vivo* Depletion von CD8 T-Zellen in latent infizierten, B-Zell defizienten Mäusen (μ^{-}/μ^{-} ; C57BL/6) führt zur Virus-Rekurrenz. Die Inzidenz der Rekurrenz konnte jedoch durch zusätzliche Depletion von CD4 T-Zellen sowie von NK-Zellen noch erhöht werden (Polic et al., 1998). In dieser Arbeit wurde nur die Rekurrenz von infektiösem Virus gemessen; die Reaktivierung der Genexpression wurde dagegen nicht analysiert. Es wäre deshalb auch denkbar, dass CD8 T-Zellen nicht die Reaktivierung der Genexpression in der latent infizierten Zelle kontrollieren, sondern vielmehr die nachfolgende Ausbreitung des rekurrenten Virus. Die Spezifität der pulmonalen CD8 T-Zellen im Haplotyp *H-2^b* ist bislang noch nicht untersucht.

Parallel zur Latenz-assoziierten IE1-Genexpression konnte bei in der Lunge residenten CD8 T-Zellen ein aktivierter CD62L-*low* Effektor-Memory (T-EM) Phänotyp nachgewiesen werden, was auf iterative Restimulationsereignisse durch Präsentation viraler Epitope während der Latenz schließen lässt (Holtappels et al., 1998, 2000c; Podlech et al., 2000). Die relative und auch absolute Anreicherung von CD62L-*low* CD8 T-Zellen mit Spezifität für das *L^d*-restringierte IE1-Peptid 168-YPHFMPTNL-176 kann als Indiz für die Präsentation des Peptids während der Latenz angesehen werden (Holtappels et al., 2000c). Sowohl für das IE1-Protein pp76/89 als auch für das IE1-Peptid sind die sensitivsten biochemischen Methoden nicht ausreichend, um eine Größenordnung von 10 Transkriptionsereignissen pro Lunge, also pro $\sim 6 \times 10^7$ Zellen nachzuweisen.

1.6 CMV-Mutagenese mittels BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*)-Technologie

Die genetische Analyse kleiner DNA-Viren profitierte bislang von der Möglichkeit der Klonierung vollständiger viraler Genome in Plasmid-Vektoren, wodurch eine Manipulation viraler DNA-Sequenzen mittels etablierter molekularbiologischer Techniken (Sambrook & Russel, 2001) *in vitro* und in *E. coli* ermöglicht wurde. Dagegen stellte für viele Jahre die Größe der CMV-Genome von ca. 230kbp (siehe 1.2.2) eine schwer überwindbare Klonierungs-Barriere dar. Nur durch die Entwicklung neuer Klonierungs-Vektoren, z. B. durch das von *E. coli* F-Faktor-abgeleitete BAC mit einer Klonierungs-Kapazität von bis zu 300kbp (Shizuya et al., 1992), konnte die Klonierung von kompletten CMV-Genomen realisiert werden.

Die Integration der BAC-Vektor-Sequenz in das virale Genom erfolgt über Homologe Rekombination unter Verwendung zellulärer Rekombinationsmechanismen (siehe Abb. 1.5A). Dazu wurde ein Rekombinations-Plasmid konstruiert, in dem die BAC-Vektor-Sequenz von viralen DNA-Sequenzen, homolog zum geplanten Insertionsort im viralen Genom, flankiert ist. Das linearisierte Rekombinations-Plasmid wurde in Fibroblasten transfiziert, gefolgt von Infektion mit

dem jeweiligen CMV-Stamm (Messerle et al., 1997; Borst et al., 1999). Rekombinante Viren mit integrierter BAC-Vektor-Sequenz konnten in Gegenwart von Mycophenolsäure und Xanthin mit dem Guanosin Phosphoryl Transferase (*gpt*)-Gen als Selektionsmarker (Greaves et al., 1995) selektioniert werden. Nach Amplifikation rekombinanter Viren wurden zirkularisierte Replikations-Intermediate der viralen Genome isoliert (Hirt et al., 1967) und in *E. coli* transformiert. Bakterielle Klone mit CMV-BAC-Plasmiden konnten anschließend mittels BAC-Vektor-codierter Antibiotikaresistenz selektioniert werden. Die so erhaltenen CMV-BAC-Plasmide konnten infolge der *repE*, *oriS*, *paraA*, *B* und *C* Elemente des BAC-Vektors stabil in geeigneten *E. coli* vermehrt werden (Shizuya et al., 1992; Messerle et al., 1997; Borst et al., 1999).

Da die ursprüngliche Insertion der etwa 8kbp großen BAC-Sequenz die Virusgenom-Länge auf ca. 238kbp vergrößerte und überlange CMV-Genome vermutlich ineffizienter verpackt werden, ergaben sich spontane Deletionen innerhalb der CMV-BAC-Genome (Messerle et al., 1997). Infolgedessen konnten zunächst keine vollständigen, infektiösen CMV-Genome isoliert werden. Um stabile CMV-BAC-Plasmide zu erhalten, wurden daher einige nicht-essentielle virale Sequenzen deletiert und durch die BAC-Vektor-Sequenz ersetzt (Messerle et al., 1997, Borst et al., 1999). Diese Strategie führte schließlich zum Erfolg; nach Transfektion in permissive Zellen kam es zur Bildung von Plaques durch infektiöse Virionen (siehe Abb. 1.5B).

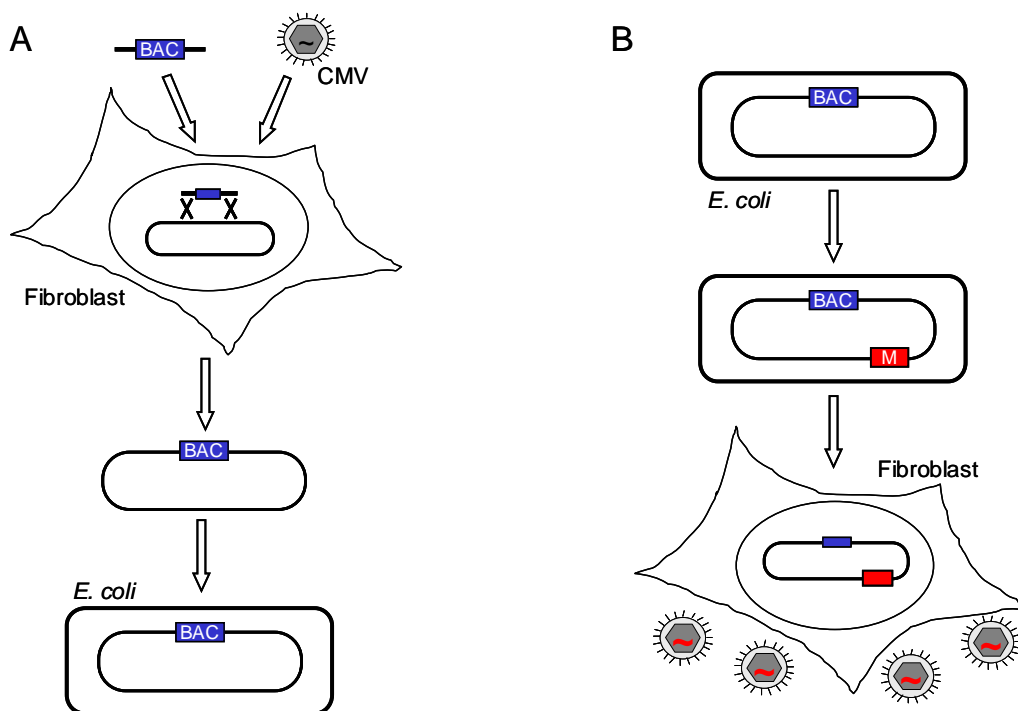


Abb. 1.5 Schematische Darstellung der Klonierung eines CMV als BAC und Virusrekonstitution. A: Ein linearisiertes BAC-Replikon (BAC, blau) flankiert von homologen viralen-Sequenzen wird in Fibroblasten transfiziert, die anschließend mit CMV infiziert werden. Virale Genome welche die BAC-Kassette über homologe Rekombination in ihr Genom integriert haben, werden isoliert und in *E. coli* transformiert. B: Prinzip der Generierung mutierter CMVs mittels BAC-Technologie. Nach Insertion einer Mutation (M, rot) in das in *E. coli* enthaltene BAC-Plasmid wird das mutagenisierte BAC-Plasmid in Fibroblasten transfiziert und es kommt zur Rekonstitution von Virusmutanten. Verändert nach Brune et al., 2005.

Zur Wiederherstellung vollständiger viraler Genome mussten die zuvor deletierten Sequenzen in die CMV-BACs re-inseriert werden. (Wagner et al., 1999, Hobom et al., 2000). Da die resultierenden Genome wiederum eine Überlänge besaßen, war es erforderlich, Strategien zur Eliminierung der Vektorsequenzen zu entwickeln. Zu diesem Zweck wurden die BAC-Vektor-Sequenzen im mCMV-BAC-Genom mit identischen viralen-Sequenzen flankiert, die in eukaryotischen Zellen durch homologe Rekombination zur spontanen Exzision der BAC-Sequenzen führten (Wagner et al., 1999). Durch Exzision der BAC-Sequenzen in Kombination mit einem Selektionsdruck gegen die Verpackung von Überlängengenomenen konnten CMVs ohne BAC-Vektor-Sequenzen generiert werden. Somit sind die hergestellten rekombinanten CMVs von Wildtyp-CMV (WT-CMV) nur noch aufgrund einer inserierten Mutation zu unterscheiden (siehe Abb. 1.5B).

Nach der Klonierung von mCMV als BAC konnten eine Reihe weiterer humaner und tierischer rekombinanter CMV kloniert werden (zur Übersicht siehe Brune et al., 2005).

1.6.1 Zielgerichtete Mutagenese eines mCMV-BAC-Plasmids mittels Zwei-Schritt-Rekombinationsverfahren

Mögliche Veränderungen im mCMV-BAC-Genom reichen von vollständiger Deletion oder Inaktivierungen von Genen bis hin zu einzelnen Nukleotidaustauschen (Punktmutationen) sowie Insertionen von zusätzlichen DNA-Sequenzen. Die geplanten Manipulationen im mCMV-BAC-Genom können jedoch nur durch homologe Rekombination realisiert werden. Dazu wird das mutierte Allel mit Hilfe eines *Shuttle*-Plasmids in ein mCMV-BAC-Plasmid-tragendes *E. coli* transformiert. Die homologe Rekombination zwischen *Shuttle*-Plasmid und mCMV-BAC-Plasmid wird durch das RecA-Protein und die Exonuklease V von *E. coli* ermöglicht, die von den Genen *recABCD* (Smith, 1988; Egglestone & West, 1996; 1997) codiert werden. Zur Vermeidung spontaner Rekombinationsereignisse zwischen internen viralen Sequenz-Wiederholungen bzw. zwischen viralen- und bakteriellen-Sequenzen, werden mCMV-BAC-Plasmide in *RecA*-negativen *E. coli* Stämmen (z. B. DH10B) propagiert. Nur für die homologe Rekombination muss für kurze Zeit das Rekombinationssystem eingeschaltet werden. Aus diesem Grund wurde das *recA*-Gen in das *Shuttle*-Plasmid inkloniert, um somit eine transiente Expression des RecA-Proteins in *recA* negativen *E. coli* Stämmen zu ermöglichen (Borst et al., 1999; Hobom, et al., 2000).

Eine homologe Rekombination zwischen dem mutierten Allel auf dem *Shuttle*-Plasmid und dem parentalen Allel im mCMV-BAC-Vektor führt zur Bildung eines Cointegrates (siehe Abb. 1.6A). Diese Rekombinationsereignisse sind selten, aber durch gezielte Selektionsverfahren ist eine Identifizierung von bakteriellen Klonen mit enthaltenen Cointegraten möglich. Da das *Shuttle*-Plasmid auf dem pSC101 Replikon basiert, erfolgt seine Replikation temperatursensitiv (Pósfai et., 1997; Borst et al., 2004). Somit können bakterielle Klone, die Cointegrate enthalten, durch Erhöhung der Temperatur, die nicht-permissiv für die Replikation des *Shuttle*-Plasmids ist, selektioniert werden. Zusätzlich wird auf Antibiotikaresistenzen selektioniert, die vom BAC-Vektor

Anteil und vom *Shuttle*-Plasmid codiert werden (Borst et al., 2004). Dadurch können nur bakterielle Klone replizieren, welche die DNA-Sequenz der *Shuttle*-Plasmide in ihr mCMV-BAC-Plasmid integriert haben.

Die Auflösung der Cointegrate erfolgt spontan über homologe Rekombination, wobei auch dies ein äußerst seltenes Ereignis darstellt. Folglich war es nötig, gegen Bakterien, die das Cointegrat noch enthalten, zu selektionieren. Dazu wurde der negativ Selektionsmarker *sacB* verwendet, der eine Identifizierung mutierter mCMV-BAC-Plasmide ermöglicht (Borst et al., 1999, 2004; Chang & Barry, 2003). Je nachdem ob die Auflösung über die gleiche homologe Sequenz, die auch zur Bildung des Cointegrates verwendet wurde, oder über die Sequenz, welche die Mutation auf der Gegenseite flankiert, erfolgt, entsteht entweder ein mCMV-BAC-Wildtyp (mCMV-BAC-WT)-Plasmid oder ein mutiertes mCMV-BAC-Plasmid. Eine erfolgreiche Mutagenese, z. B. die Insertion einer Punktmutation, muss durch Restriktions-Analyse, PCR und/oder Sequenzierung verifiziert werden. Das Zwei-Schritt-Rekombinationsverfahren hinterlässt keinerlei methodenbedingte nichtvirale-Sequenzen im mCMV-Genom und ist somit beispielsweise für den Austausch von Aminosäuren in Proteinen die Methode der Wahl.

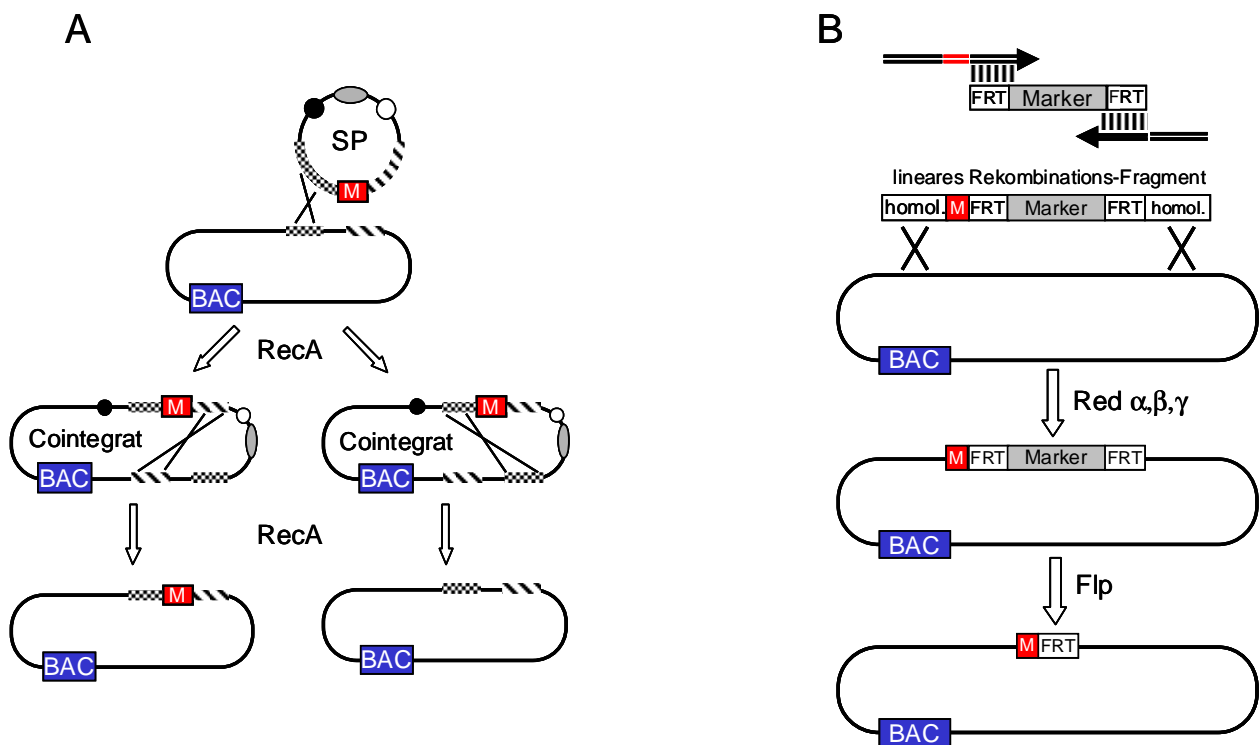


Abb. 1.6 mCMV-BAC-Mutagenese Verfahren in *E. coli*. A: Zwei-Schritt-Rekombinationsverfahren. Eine Mutation (M, rot) flankiert von viralen-Sequenzen (schraffiert und schräg-schraffiert) wurde in ein *Shuttle*-Plasmid (SP) kloniert. Das SP enthält einen positiv Selektionsmarker (graue Ellipse) sowie einen negativ Selektionsmarker (*sacB*, schwarzer Kreis) und die für die homologe Rekombination benötigte RecA (weißer Kreis). Transformation des SP in *E. coli*, die ein mCMV-BAC-Plasmid tragen, führt zur homologen Rekombination und Bildung eines Cointegrates. In einem zweiten Rekombinationsschritt kommt es zur Auflösung des Cointegrats und es wird entweder ein mutiertes (links) oder ein Wildtyp (rechts) Genom erhalten. B: Ein-Schritt-Rekombinationsverfahren. Ein Selektionsmarker flankiert von FRT-Erkennungssequenzen (FRT) und einer Mutation wird durch PCR amplifiziert. Das lineare PCR-Produkt (lineares Rekombinations-Fragment) wird in *E. coli* elektroporiert, welche die Gene *red* α , β und γ des

Phagen λ exprimieren. Der Selektionsmarker kann unter Verwendung von FLP-Rekombinase entfernt werden (verändert nach Brune et al., 2005).

1.6.2 Zielgerichtete Mutagenese eines mCMV-BAC-Plasmids mittels Ein-Schritt-Rekombinationsverfahren

Der Klonierungsaufwand des Zwei-Schritt-Rekombinationsverfahrens war Anlass zur Suche nach schnelleren Mutageneseverfahren. Als geeignete Möglichkeit erwies sich die Verwendung linearer DNA-Fragmente. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Insertion eines PCR-Fragmentes über zwei simultane Rekombinationsereignisse (*Doppel-Crossing-overs*) in das mCMV-BAC-Plasmid. Das PCR-Fragment beinhaltet einen Selektionsmarker (z. B. Neomycin-Phosphotransferase, Kan^{Res}), flankiert von DNA-Sequenzen homolog zum viralen Integrationsort. Als Rekombinationssystem werden die *red α* und *red β* Funktionen des Bakteriophagen λ verwendet, die lineare DNA-Fragmente als Substrate nutzen (Oliner et al., 1993; Zhang et al., 1998). Diese Rekombinations-Proteine sind höchst effizient und benötigen nur 30 bis 50 Nukleotide lange homologe Sequenzen (Wagner & Koszinowski, 2004), um erfolgreich eine homologe Rekombination zu vermitteln. Die Rekombinations-Proteine werden von *low-copy* Vektoren (Datsenko & Wanner, 2000) exprimiert und sorgen somit für ein adäquates Niveau dieser Proteine. Um eine schnelle Degradation der linearen DNA-Fragmente in *E. coli* zu vermeiden, wird zusätzlich der Exonuklease-Inhibitor *red γ* des Bakteriophagen λ benötigt, der zusammen mit den Rekombinationsfunktionen co-exprimiert wird.

Das lineare Rekombinations-Fragment kann via PCR unter Verwendung von synthetischen Oligonukleotiden mit bereits integrierten homologen viralen-Sequenzen als Primer für die Amplifikation des Selektionsmarkers generiert werden (siehe Abb. 1.5B). Da die Homologie-Arme frei gewählt werden können, ist diese Methode nicht an die Existenz von Restriktionsschnittstellen im viralen Genom gebunden und vermeidet so präparative Klonierungsschritte.

Neben Deletionen von Genen im mCMV-BAC-Genom durch Substitution der viralen-Sequenzen durch einen Selektionsmarker können auch zusätzliche Sequenzen (z. B. eine Epitop-Sequenz aus dem Hämagglutininprotein (HA) des Influenza-A-Virus), die zwischen Marker und der homologen Region inseriert sind, in das mCMV-BAC-Genom integriert werden (siehe Abb. 1.6B, Bildmitte). Wenn das lineare DNA-Fragment über PCR generiert wird, ist die Länge der Insertion nur durch die technische Limitierung während der Oligonukleotid-Synthese definiert. Der Selektionsmarker kann nach der Mutagenese durch FLP-Rekombinase über FRT-Erkennungssequenzen entfernt werden (siehe Abb. 1.6B) (Wagner et al., 2002, Wagner & Koszinowski, 2004). Im Gegensatz zum Zwei-Schritt-Rekombinationsverfahren verbleibt eine FRT-*Site* im rekombinanten Virusgenom.

1.7 Zielsetzung

Die Mechanismen der Etablierung und Aufrechterhaltung der Herpesvirus-Latenz sind trotz intensiver Forschung noch weitgehend unverstanden. Dies gilt in besonderem Maße für die β -*Herpesvirinae*.

Während der Latenz in der Lunge wird das *ie1* Gen sporadisch, zu jedem Zeitpunkt in einem geringen Anteil der latenten viralen Genome exprimiert (Kurz et al., 1999; Grzimek et al., 2001). Dabei handelt es sich um ein so niederfrequentes Ereignis, dass in der Lunge weder IE1-Protein (pp76/89) noch prozessiertes IE1-Peptid nachgewiesen werden konnten. Gleichzeitig reichern sich IE1-Epitop-spezifische CD8 T-Zellen in der Lunge während der Latenz relativ zu CD8 T-Zellen anderer Spezifitäten und auch absolut an, und zwar in einer Population aktivierter CD62L-*low* CD8 T-Zellen (Holtappels et al., 2000c). Bisher fehlte die Verknüpfung beider Evidenzen durch Nachweis von IE1-Proteinsynthese, IE1-Antigenprozessierung, und Präsentation des IE1-Peptids.

Als Hypothese kann eine Kontrolle der Latenz durch in der Lunge angereicherte IE1-Peptid-spezifische CD8 T-Zellen postuliert werden.

Wenn die in der Lunge angereicherten IE1-Peptid-spezifischen CD8 T-Zellen die Latenz-assoziierte IE1-Genexpression bestimmen und die Progression der viralen Genexpression verhindern, dann sollte das Expressionsmuster bei fehlender Präsentation des IE1-Peptids verändert sein.

Zur Prüfung der Hypothese sollte in der vorliegenden Arbeit eine Virusmutante generiert werden, in der die Präsentation des IE1-Peptids 168-YPHFMPTNL-176 selektiv durch die Punktmutation L176A in der C-terminalen MHC-Klasse-I-Ankeramino-säure verhindert wird. Neben der Funktionsverlust-Mutante sollte ein Set an unterschiedlichen IE1-Revertanten hergestellt werden, in denen die Präsentation des IE1-Peptids wieder ermöglicht wird. Zur Generierung dieser mCMV-Rekombinanten sollte die Technik der BAC-Mutagenese herpesviraler Genome mittels Zwei-Schritt-Rekombinationsverfahren (Messerle et al., 1997; Borst et al., 1999, 2004; Wagner et al., 1999) in der Arbeitsgruppe etabliert werden.

Zur Klärung der Rolle des zweiten immundominanten mCMV-Peptids, des von MHC Klasse-I D^d präsentierten Peptids 257-AGPPRYSRI-265, aus dem ORF $m164$, sollte analog die Präsentation durch die Mutation I265A verhindert werden. Zusätzlich sollte die Generierung einer Doppelmutante mit Punktmutationen in den C-terminalen MHC-Ankerpositionen beider immundominanten Peptide erfolgen. Auch für diese Mutanten sollten entsprechende Revertanten, die eine Präsentation der Peptide wieder ermöglichen, hergestellt werden.

Abschließend sollte für alle Virus-Rekombinanten eine detaillierte molekulare, virologische und immunologische Charakterisierung *in vitro* und *in vivo* durchgeführt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Allgemeine Laborgeräte und Reagenzien

2.1.1 Allgemeine Laborgeräte

Axiophot	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Brutschrank B6 und T18 (Bakterien)	Heraeus, Hanau
Brutschrank B15 und B16 (Zellen)	Heraeus, Hanau
CO ₂ -Inkubation	Heraeus, Hanau
Desktop Film Scanner LS-100	Nikon, Düsseldorf
Elektroporator	Gene Pulser™ (BioRad, München)
Flüssigstickstofftank	Messer, Griesheim
Photometer	GeneQuant (Pharmacia, Erlangen)
Geldokumentationsanlage	Digit Store (INTAS, Göttingen)
Heizplatte/Magnetrührer	IKA Combimag RET (Janke & Kunkel, Staufen)
Hybridisierungsöfen	Biometra OV 3 (Biometra, Tampa, FL, USA)
Invertmikroskop	Leitz DM (Leitz, Wetzlar)
Luminometer	(Lumat LB 9507; Berthold, Bad Wildbad)
Mikrotom	Mikrotom HM 355 (Microm, Walldorf)
Multikanalpipetten	Gilson, Villies Le Bel, Frankreich
Pipetten	Gilson, Villies Le Bel, Frankreich
	Eppendorf, Hamburg
	Rainin, Mettler Toledo, Oakland, CA, USA
Paraffinerhitzer	HistoTAPplus (Leica, Bensheim)
<i>Power Supply</i>	EPS 600 (Pharmacia, Erlangen)
Präparative Zentrifuge	Sorvall RC5C Plus, Langenselbold
Schüttelinkubator	Cellstar (NUNC, Wiesbaden)
	Certomat (Labotec, Wiesbaden)
Schwingmühle MM 300	QIAGEN, Hilden; Retsch (GmbH & Co. KG, Haan)
Sequenzier-Anlage	<i>LI-COR-DNA-Sequencer</i> Model 4000 (LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg)
Sterile Werkbank	Heraeus Lamin Air HB 2472, HV 2472 und HS 15/2, Hanau
<i>TaqMan</i>	ABI Prism 7700, Sequence Detection System (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA)
Tischzentrifugen	Mikrozentrifuge C-1200 (National Labnet, Woodbridge, NY, USA)
	Megafuge 2.0 (Heraeus, Hanau)
	Labofuge 200 (Heraeus, Hanau)
	Labofuge 400 (Heraeus, Hanau)
	centrifuge 5417 (Eppendorf, Hamburg)
	centrifuge 5417C (Eppendorf, Hamburg)
	centrifuge 5417R (Eppendorf, Hamburg)

<i>Thermocycler</i>	Trio-Thermoblock (Biometra, Göttingen) GenAmp PCR System 9700 (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA)
Thermoschüttler	Eppendorf, Hamburg
UV-Transilluminator	FluoLink (Bachofer, Reutlingen) Vetter GmbH, Wiesbaden
Ultrazentrifuge	Sorvall Combi Plus, Langenselbold
Vollschutzbestrahlungsanlage	Typ OB 58-BA (Buchler, Braunschweig)
Waagen	BP 61 (Sartorius, Göttingen) Kern 510, Albstadt
Zählmikroskop <i>ELISpot</i>	Olympus SZX 12 und Highlight 3100 (Olympus, Japan)
Zählmikroskop Zellen	Nikon SE (Nikon, Düsseldorf)

2.1.2 Plastikwaren und Verbrauchsmaterialien

Einblock-Kassetten	<i>Tissue</i> Tek III (Sakura Finetek BV, Zoeterwoude, NL)
Einfrierröhrchen	1,8ml <i>CryoTube</i> Vials (Nunc International, Dänemark; Nr. 375418)
Einmal-Plastikpipetten	10ml (Greiner, Nürtingen; Nr. 607180) 25ml (Greiner, Nürtingen; Nr. 760180)
Einmal-Spritzen	1ml (Braun, Melsungen; Nr. 916140/6) 2ml (Braun, Melsungen; Nr. 04606027) 10ml (Braun, Melsungen; Nr. 04606108) 50ml (Becton Dickinson, Heidelberg, Nr. 308500)
Elektroporations-Küvetten	<i>Gene Pulser</i> Küvetten 0,2cm Spaltbreite (BioRad, München; Nr. 165-2086)
Filtereinheit für <i>ELISpot</i> und Sequenzierung	FP 30 0,8µm, Grünrand (Schleicher & Schuell; Nr. 1061904)
Kanülen	0,40×20mm (Braun, Melsungen) 0,45×12mm (Braun, Melsungen)
Mahlkugeln für MM 300, (3mm, 4mm) rostfreier Stahl	Wälzlager-Vertrieb Wiesbaden GmbH, Mainz-Kastel
Mikrotiterplatten	96- <i>Well</i> -Flachbodenplatten (Greiner, Nürtingen; Nr. 655180) 96- <i>Well</i> -Rundbodenplatten (Greiner, Nürtingen; Nr. 650180)
Reaktionsgefäße	1,5ml (Sarstedt, Nürnberg; Nr. 72.690) 1,5ml ohne Deckel (Brandt; Nr. 780505) 2,0ml Safe Seal (Sarstedt, Nürnberg; Nr. 72.695)
Reaktionsgefäße (PCR)	0,5ml Safe Lock (Eppendorf, Hamburg; Nr. 35325) 0,2ml MicroAmp ^R mit Deckel (Applied Biosystems, Foster, CA, USA; Nr. N801-0840) 0,2ml MicroAmp ^R Optical Tubes ohne Deckel (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA; N801-0933) und

	Optical Caps (8Caps/strip) MicroAmp ^R (Applied Biosystems, Foster, CA, USA; Nr. N801-0935)
Reaktionsplatten (PCR)	96-Well MicroAmp ^R Optical (Applied Biosystems, Foster, CA, USA; Nr. N801-0560)
Sterilfilter	FP 030/3 Einmal-Filterhalter 0,2µm, Rotrand Schleicher & Schuell; Nr. 462200 FP 030/2 Einmal-Filterhalter 0,45µm, Weisrand (Schleicher & Schuell; Nr. 462200)
Zellkulturflaschen	150ml Easy Flow TM Filter 0,22µm (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 357107) 25cm ² (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 353014) 75cm ² (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 353135)
Zellkulturplatten	6-Well-Flachbodenplatten (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 353046) 24-Well-Flachbodenplatten (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 353047) 48-Well-Flachbodenplatten (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 353078)
Zellkulturschalen	60/15mm (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 353004) 100/20mm (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 353003) 150/25mm (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 353025)
Zellnylonsieb	100µm (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 352360)
Zentrifugenröhrchen	50ml Spitzboden (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 353070) 14ml Spitzboden (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 352096) 5ml Rundboden (Greiner, Nürtingen, Heidelberg; Nr. 115261) 13ml für BAC Aufreinigung, 95×16,8mm, PP (Sarstedt, Nümbrecht; Nr. 55.518) 36ml für UZ, PP (Sorvall, Newtown, CT, USA; Nr. 03141)

2.1.3 Chemikalien

Alle aufgelisteten Chemikalien und Reagenzien wurden, wenn nicht anders vermerkt, in p.a. Qualität bezogen. Puffer und Lösungen wurden in erster Linie mit VE-Wasser (Millipore, Molsheim, Frankreich, im Folgenden als H₂O_{demin.} bezeichnet) hergestellt, für bestimmte Puffer und Lösungen

wurde Aqua bidest. aus der Apotheke der Universität Mainz (Aqua adiniectabilia, Braun Melsungen, im Folgenden als $H_2O_{\text{reinst.}}$ bezeichnet) verwendet.

Acetonitril (HPLC analyzed)	Baker, Deventer, Holland, Nr. 9017
Agarose (SeaKem LE)	BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, ME, USA (Biozym: 840.004)
Agarose Multi Purpose	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München; Nr. A-9164
Bacto Agar	Difco, Detroit, Michigan, USA
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Bovines Serum Albumin (BSA)	
für Zellkultur	Serva, Heidelberg
BSA für Histologie	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München; Nr. A-7906
Calciumchlorid ($CaCl_2 \times 2H_2O$)	Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München; Nr. C-0378
Chloroform	Roth, Karlsruhe
n,n-Dimethylformamid (DMF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München; Nr. D-4254
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DNA-Längenstandards	1kbp Leiter New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
	0,5kbp Leiter Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
	100bp Leiter, Invitrogen, Karlsruhe
Essigsäure 100% (v/v) (HAc)	Roth, Karlsruhe
Ethanol 100% (v/v)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid (100ml)	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamin-tetra-essigsäure	
Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd säurefrei 37% (v/v)	Roth, Karlsruhe
Formalin 37% (v/v) für Histologie	Merck, Darmstadt, Nr. K31602203302
Hämalaun nach Mayer	Roth, Karlsruhe
Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Hedinger, Stuttgart über Apotheke Universitäts-Klinikum Mainz
Kaliumacetat (KAc)	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Karlsruhe
Kanamycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München; Nr. K-4000
Kaninchenserum	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Magnesiumchlorid ($MgCl_2 \times 6H_2O$)	Roth, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol (ME)	Roth, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
Methylzellulose	Fluka, Buchs SG, Schweiz
Natriumacetat (NaAc)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München; S-8625

Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄ ×H ₂ O)	Roth, Karlsruhe
Desoxyribo-Nukleotidtri- phosphate (dNTP)	MBI Fermentas, St-Leon-Rot
Paraffin	Vogel, Gießen
Roti-Phenol	Roth, Karlsruhe; Nr. 0038.1
Roti-Phenol/Chloroform	Roth, Karlsruhe; Nr. A156.1
Polyoxoethylensorbitan Monolaurat (Tween 20)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München; Nr. P-1379
Salzsäure (HCl) 25%	Merck, Darmstadt
Saccharose	Merck, Darmstadt
Sequence complete	National Diagnostics, Atlanta, Georgia, USA; Nr. EC- 841
Sequence XR	National Diagnostics, Atlanta, Georgia, USA; Nr. EC- 842
Trypsin/EDTA	PAA, Pasching, Österreich
Wasserstoffperoxyd 30% (v/v) (H ₂ O ₂)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München; Nr. H-1009
X-Gal	Roth, Heidelberg
Xylol für Histologie	Merck, Darmstadt, Nr. 430883085231
Yeast extract Servabacter	Serva, Heidelberg

2.1.4 Radiochemikalien

³² P-γ-ATP (1mCi/ml)	PerkinElmer Life Sciences, Rodgau-Jügesheim
---------------------------------	---

2.1.5 Enzyme

Alle enzymatischen Reaktionen erfolgten bei den vom jeweiligen Hersteller angegebenen Temperaturen und mit den mitgelieferten Puffern.

<i>Calf Intestinal Phosphatase</i> (CIP)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
DNase I (RNase frei)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim; Nr. 776785
<i>HotStar</i> Taq-DNA-Polymerase	QIAGEN, Hilden
Proteinase K	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	Gibco-BRL, Eggenstein MBI Fermentas, St. Leon-Rot New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
RNase (DNase frei)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim; Nr. 1119915

Polynukleotid Kinase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim; Nr. 174645
<i>ProofStart</i> DNA-Polymerase	QIAGEN, Hilden
Taq DNA-Polymerase	QIAGEN, Hilden
	Gibco-BRL, Eggenstein
T4 DNA Ligase	Invitrogen, Karlsruhe
DNA-Polymerase I, Large Fragment (Klenow-Fragment)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main; Nr. #M0210S

2.1.6 Antikörper

ELISpot-Assay:

Primärantikörper Ratte anti-Maus IFN γ <i>clone</i> RMMG-1 (5mg/ml)	Biosource Europe; Nr. AMC 4834
Sekundärantikörper Ratte anti-Maus IFN- γ Biotin markiert, <i>clone</i> XMG1.2 (0,5mg/ml)	Pharmingen; Nr. 18112D
Peroxidase-konjugiertes (HRPO)-Streptavidin	Jackson Immuno Research, Dianova; Nr. 016-030-084

Magnetic cell sorting (MACS):

MACS <i>MicroBeads</i> konjugiert an Ratte anti-Maus CD8 (Ly-2), IgG2a, Kit	kolleoidale super-paramagnetische Miltenyi Biotec; Nr. 494-01
---	---

Histologie:

Maus anti-mCMV-IE1 (pp89), IgG1 polyklonale Maus IgG	Croma 101, Prof. Jonjic, Rijeka, Kroatien
gerichtet gegen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München; Nr. M-5899
biotinylierte polyklonale Ziege Antikörper gerichtet gegen Maus IgG (Fab)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München; Nr. B0529
ABC-POD-Kit (PK-4000)	Vectastain PK-4000 von Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA

2.2 Viren

mCMV (WT-mCMV): Die Infektion von Zellkulturen und Versuchstieren erfolgte mit dem Laborstamm des murinen Cytomegalovirus (mCMV, *Smith strain*, Smith, M. G. 1954, ATCC VR-

194, neue Bezeichnung VR-1399). Ausgehend von diesem Virusstamm wurde das gesamte mCMV-Genom sequenziert (Rawlinson et al., 1996).

MW97.01 (mCMV-BAC-WT): Diese chimäre mCMV-Rekombinante besteht überwiegend aus der Nukleotidsequenz des Laborstamms ATCC VR-1399 und einem Anteil der Nukleotidsequenz (HindIII-E'-Fragment) des mCMV-Laborstamms K181. Nach Klonierung des gesamten mCMV-Genoms in ein BAC und anschließender Transfektion in murine embryofetale Fibroblasten, konnte das Virus MW97.01 nach erfolgreicher Rekonstitution aus dem Überstand isoliert werden (Wagner et al., 1999). *In vivo* Experimente mit MW97.01 zeigten keine Unterschiede in den biologischen Eigenschaften im Vergleich zu WT-mCMV Smith (Wagner et al. 1999). mCMV-BAC-WT wurde unserer Arbeitsgruppe freundlicherweise von U. H. Koszinowski, Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Mikrobiologie in München, zur Verfügung gestellt.

Rekombinante mCMV, die in dieser Arbeit mittels BAC-Mutagenese generiert wurden:

mCMV-IE1-L176A (Funktionsverlust-Mutante): Diese Mutante enthält eine gezielte Punktmutation L176A in der C-terminalen MHC-Klasse-I (hier L^d) Ankeraminosäure des IE1-Peptids (168-YPHFMPTNL-176, Reddehase et al., 1989), wodurch die Präsentation des IE1-Peptids verhindert wird.

mCMV-IE1-A176L (authentische Revertante): Bei dieser authentischen Revertante von mCMV-IE1-L176A wurde die Punktmutation in der C-terminalen Ankerposition des IE1-Peptids zu A176L revertiert, so dass die Präsentation des IE1-Peptids wieder stattfindet.

mCMV-IE1-A176L* (Wobble-Revertante): Neben der authentischen Revertante wurde eine, durch die *Wobble*-Position des Codons genetisch markierte Revertante A176L* generiert. Auch hier kann das IE1-Peptid wieder präsentiert werden.

mCMV-IE1-A176F (funktionelles IE1-Analogon): Das in dieser Mutante prozessierte IE1-F-Peptid bindet mit gleicher Affinität an L^d wie das authentische IE1-L-Peptid (Reddehase und Koszinowski 1991, Rognan et al., 1992) und wird am Proteasom mit gleicher Effizienz generiert (persönliche Mitteilung P.-M. Kloetzel und U. Kuckelkorn, Charite, Berlin).

mCMV-m164-I265A (Funktionsverlust-Mutante): Diese Mutante beinhaltet eine gezielte Punktmutation I265A in der C-terminalen MHC-Klasse-I (hier D^d) Ankeraminosäure des m164-Peptids (257-AGPPRYSRI-265, Holtappels et al., 2002a, c), wodurch die Präsentation des m164-Peptids verhindert wird.

mCMV-m164-A265I (Revertante): In dieser Revertante wurde die Punktmutation I265A in der C-terminalen Ankerposition des m164-Peptids zu A265I revertiert und somit die Präsentation des m164-Peptids wieder ermöglicht.

mCMV-IE1-L176A-m164-I265A (Doppelmutante): In dieser Mutante wurden beide immundominanten Peptide (IE1 und m164) von mCMV durch Punktmutationen in den C-terminalen Ankeraminoacids gelöscht.

mCMV-IE1-A176L-m164-A265I (Doppelrevertante): In dieser Doppelrevertante wurden die Punktmutation in der C-terminalen Ankerposition der immundominanten Peptide revertiert, so dass beide Peptide wieder präsentiert werden können.

mCMV-m164-3'HAtag: Virusmutante, die am 3'-Ende des m164-Proteins eine HA-Epitop-Sequenz (YPYDVPDYA) aus dem Hämagglutininprotein des Influenza-A-Virus enthält.

mCMV-m164-5'HAtag: Virusmutante, die am 5'-Ende des m164-Proteins eine HA-Epitop-Sequenz (YPYDVPDYA) aus dem Hämagglutininprotein des Influenza-Virus enthält.

2.3 Materialien für die Zellkultur

Alle Medien, Lösungen und Zusätze für die Zellkultur wurden, wenn nicht anders vermerkt, mit H₂O_{reinst.} angesetzt und bei Bedarf durch 0,2µm Membranfilter steriltfiltriert. Die Lagerung erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei 4°C.

2.3.1 Reagenzien und Medienzusätze

Fötales Kälberserum (FCS): FCS wurde den Kulturmedien von Zellen zugesetzt. Vor der Verwendung wurde seine Eignung für verschiedene Zelltypen, insbesondere für MEF (murine embryofetale Fibroblasten), getestet. Die sterilen und auf Mycoplasmen getesteten Seren wurden von der Firma PAA Laboratories (Pasching, Österreich) bezogen und bei -20°C gelagert. Vor Gebrauch wurden sie bei 4°C aufgetaut und anschließend für 35-40min bei 56°C im Wasserbad zur Komplement-Inaktivierung inkubiert. Das hitze-inaktivierte FCS wurde bei 4°C aufbewahrt.

Geneticin (G-418): G-418-Sulfat, Nr. 11811-031 (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe) wurde als Selektionsagens bestimmten Kulturmedien zugesetzt. Dazu wurde eine Stocklösung von 100mg/ml hergestellt und in einer Endkonzentration von 0,167mg/ml (Zelllinie: P815/B7) eingesetzt. Geneticin ist ein Gentamycin-Derivat, das toxisch auf prokaryotische und eukaryotische Zellen wirkt. In eukaryotischen Zellen interagiert es mit den 80S-Ribosomen und blockiert dadurch

die Proteinbiosynthese. Nur Zellen, die mit einem Neomycin-Resistenzgen tragenden Plasmid transfiziert worden sind, können in G-418-haltigem Medium wachsen.

L-Glutamin: Wurde als L(+)-Glutamin-Stammlösung (200mM in 0,9% (w/v) NaCl, Nr. M11-004) von PAA Laboratories (Pasching, Österreich) bezogen und in 5ml Aliquots bei -20°C gelagert. Einem 5ml Aliquot wurde 500ml Kulturmedium zugesetzt (Endkonzentration: 2mM).

HEPES: Dieser im physiologischen pH-Bereich wirksame Puffer bewirkt eine verbesserte Pufferung und erhöht somit die pH-Stabilität bei schnellwachsenden Kulturen mit starker Ansäuerung. Die 1M Lösung (PAA Laboratories, Pasching, Österreich, Nr. S11-001) wurde in 5ml Aliquots bei 4°C gelagert. Pro 500ml Kulturmedium wurde ein Aliquot HEPES zugesetzt (Endkonzentration: 10mM).

β-Mercaptoethanol (β-ME): Dieses Reduktionsmittel (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Nr. M7522) wurde den Kulturmedien als Oxidationsschutz zugesetzt. Dazu wurde eine Lösung von 100µl β-ME/100ml H₂O hergestellt und aliquotiert bei -20°C gelagert. Pro 500ml Kulturmedium wurden 1,75ml β-ME zugesetzt (Endkonzentration: 5×10^{-5} M).

Methylzellulose: Methylzellulosemedium diente bei der Bestimmung von Virustitern der Überschichtung der zuvor infizierten Zellen. 8,8g Methylzellulose (Fluka, Buchs, CH) wurde in 360ml H₂O mit einem Magnetrührer suspendiert und zusammen mit einem Magnetstab sofort autoklaviert. Die Suspension wurde dann bei 4°C unter Rühren üN gelöst und konnte bei 4°C für mehrere Monate aufbewahrt werden.

Nach Zugabe von: 40ml 10xMEM, 2mM L-Glutamin, 100U/ml Penicillin, 0,1mg/ml Streptomycin, 5% (v/v) FCS und Einstellen des pH-Wertes auf pH 7,5 mit NaHCO₃ (Stocklösung: 55g/l) war das Methylzellulosemedium gebrauchsfertig.

PBS-Puffer Dulbecco (Phosphate Buffered Saline): PBS wurde steril von der Apotheke des Klinikums der Johannes Gutenberg-Universität Mainz bezogen.

Zusammensetzung: 136mM NaCl, 26mM KCl, 8mM Na₂HPO₄ und 1,5mM KH₂PO₄.

Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep): In Kombination werden Pen/Strep gegen grampositive und gramnegative Bakterien verwendet. Eine Antibiotika-Stocklösung, bestehend aus 10000U Penicillin und 10mg/ml Streptomycin in 0,9% (w/v) NaCl wurde von der Firma PAA Laboratories (Pasching, Österreich, Nr. P11-010) bezogen. Die Stocklösung wurde in 5ml Aliquots bei -20°C gelagert und bei Bedarf dem Kulturmedium zugesetzt (Endkonzentration: 100U/ml Pen, 0,1mg/ml Strep).

Trypanblau: Die gebrauchsfertige Lösung dieses Vitalfarbstoffs (0,5% (w/v), in physiologischer Kochsalzlösung) zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen wurde von der Firma Biochrom (Berlin Nr. L 6323) bezogen.

Trypsin/EDTA: Die zum Ablösen von adharänten Zellen verwendete Lösung (PAA Laboratories, Pasching, Österreich, Nr. L11-003) wurde 1:10 mit PBS verdünnt eingesetzt (Endkonzentration: 0,5g/l Trypsin, 0,2g/l EDTA, pH 7,4-7,6).

2.3.2 Zellkulturmedien

Die Grundmedien wurden steril von der Firma PAA Laboratories (Pasching, Österreich) bezogen und mit den unter 2.3.1 aufgeführten Zusätzen supplementiert. Spezielle Medienzusätze sind bei der Aufführung der einzelnen Zellen (siehe 2.3.3) angegeben.

RPMI 1640	(<i>Roswell Park Memorial Institute</i>) Nr. E15-039; 2mM L-Glutamin, 100U/ml Penicillin, 0,1mg/ml Streptomycin, 5×10^{-5} M β -Mercaptoethanol, 10mM HEPES, 5% (v/v) FCS
Earles' MEM	(<i>Minimum Essential Medium</i>) Nr. E15-024; 2mM L-Glutamin, 100U/ml Penicillin, 0,1mg/ml Streptomycin, 5-10% (v/v) FCS
DMEM	(<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>) Nr. E15-009; 2mM L-Glutamin, 100U/ml Penicillin, 0,1mg/ml Streptomycin, 5-10% (v/v) NCS
MEM ALPHA	Nr. 22561-021 (Gibco); 2mM L-Glutamin, 100U/ml Penicillin, 0,1mg/ml Streptomycin, 5×10^{-5} M β -Mercaptoethanol, 10mM HEPES, 10% (v/v) FCS

2.3.3 Primäre Zellen, Zelllinien und Hybridome

MEF (murine embryofetale Fibroblasten): Diese primären Zellen wurden, bis einschließlich der 3. Passage zur Virustiterbestimmung und mCMV-Produktion verwendet. Die Permissivität dieser Zellen für mCMV ist hoch und die Plaquebildung gut verfolgbar. MEF wurden auch zur Rekonstitution rekombinanter Viren nach Transfektion von mCMV-BAC-DNA verwendet.

Kulturmedium: MEM + 5% (v/v) FCS

P815/B7: Die mit der humanen *B7-1* (CD80) cDNA stabil transfizierte Mastrozytom-Zelllinie P815 (Azuma et al., 1992) wurde im *ELISpot*-Assay, nach Beladung mit synthetischen Peptiden, zur Antigen-Präsentation eingesetzt.

Kulturmedium: RPMI + 5% (v/v) FCS + 0,167mg/ml G-418

Diese Zelllinie wurde freundlicherweise von Prof. Lanier, UCSF, *Department of Microbiology and Immunology*, San Francisco, CA, USA, zur Verfügung gestellt.

NIH 3T3 (BALB/c embryonale Fibroblasten NIH 3T3 (no. CRL-1658; ATCC): Sie lassen sich sehr gut transfizieren und wurden in dieser Arbeit im Dual-Luciferase Reporter Gen Assay zur Prüfung der Funktionalität mutierter IE1-Proteine verwendet.

Kulturmedium: DMEM + 5% (v/v) NCS

145-2C11: Diese Hybridom Zelllinie exprimiert anti-CD3 ϵ MAbs und diente im *ELISpot*-Assay zur polyklonalen Stimulation von CD8 T-Zellen.

Kulturmedium: RPMI + 5% (v/v) FCS

Diese Zelllinie wurde freundlicherweise von Prof. Bluestone, UCSF, *Department of Microbiology and Immunology*, San Francisco, CA, USA, zur Verfügung gestellt

2.3.4 mCMV-Peptide

Die synthetischen Peptide wurden als Lyophilisate (ca. 1mg/Peptid, Reinheit > 75%) von der Firma JERINI Bio Tools GmbH in Berlin bezogen, in 30% (v/v) Acetonitril in PBS mit einer Konzentration von 10^{-3} M gelöst und bei -70°C gelagert. Alle weiteren Verdünnungen wurden mit PBS durchgeführt.

ORF	Replikations-Phase	Peptid- Sequenz	MHC-Klasse-I-Restriktion	Referenz
<i>m04</i>	E	²⁴³ YGPSLYRRF(F) ²⁵²	D ^d	Holtappels et al., 2000a
<i>m18</i>	E	³⁴⁶ SGPSRGRIL ³⁵⁴	D ^d	Holtappels et al., 2002b
<i>M45</i>	E	⁵⁰⁷ VGPALGRGL ⁵¹⁵	D ^d	Holtappels et al., 2004
<i>M83</i>	E/L	⁷⁶¹ YPSKEPFNF ⁷⁶⁹	L ^d	Holtappels et al., 2001
<i>M84</i>	E	²⁹⁷ AYAGLFTPL ³⁰⁵	K ^d	Holtappels et al., 2000b
<i>m123ex4 (ie1)</i>	IE	¹⁶⁸ YPHFMPNTL ¹⁷⁶	L ^d	Reddehase et al., 1989
		¹⁶⁸ YPHFMPNTA ¹⁷⁶ ¹⁶⁸ YPHFMPNTF ¹⁷⁶	L ^d	Reddehase und Koszinowski., 1991
<i>m164</i>	E	²⁵⁷ AGPPRYSRI ²⁶⁵	D ^d	Holtappels et al. 2002a, c

Tab. 2.1. Liste der antigenen mCMV-Peptide (*H-2^d*), die in dieser Arbeit verwendet wurden.

2.4 Zellkulturmethoden

Zur Verhinderung von Kontaminationen der Zellkulturen mit Luftkeimen (Pilzsporen, Bakterien), wurden alle Zellkulturarbeiten an einer sterilen Werkbank, unter Verwendung steriler Glas- und Plastikgeräte, durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in CO₂-Inkubatoren (37°C, 5% (v/v) CO₂) in gesättigter Wasserdampf-atmosphäre (95% (v/v) relative Luftfeuchte). Unter diesen Bedingungen konnte die Aufrechterhaltung des physiologischen pH-Wertes der CO₃²⁻/HCO₃⁻-gepufferten Medien gewährleistet werden.

2.4.1 Kryokonservierung und Reaktivierung von Zellen

Einfriermedium: FCS 90% (v/v), DMSO 10% (v/v)

Die Aufbewahrung von Zellen bei -196°C in flüssigem Stickstoff wird als Kryokonservierung bezeichnet. Um Zellschädigungen beim Einfrieren zu minimieren, wurde dem Einfriermedium DMSO zugesetzt, das aufgrund seiner hygroskopischen Eigenschaften die Bildung von Eiskristallen verhindert.

Dazu wurden die Zellen mit einer Zellzahl von 1-5x10⁶/ml in 4°C kaltem Einfriermedium aufgenommen und in Aliquots à 1ml, auf in Eis stehenden Einfriereröhrchen verteilt. Adhärente Zellen mussten zunächst trypsinisiert werden, bevor sie wie zuvor beschrieben aliquotiert werden konnten. Die Aliquots wurden in einer isolierenden Umhüllung (Zellstoff, Styropor) langsam auf -70°C abgekühlt und nach ein bis 2 Tagen in flüssigen Stickstoff überführt. So kann eine Langzeitlagerung über Jahre ohne Verlust der Vitalität erfolgen.

Zur Reaktivierung der Zellen wurden die Aliquots unverzüglich im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Anschließend wurden sie noch 2mal in Kulturmedium gewaschen (ca. 20ml, um das toxische DMSO schnell zu verdünnen bzw. auszuwaschen), in frischem Medium resuspendiert und schließlich in Kultur genommen.

2.4.2 Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität

Der Vitalfarbstoff Trypanblau (siehe 2.3.1; Lindl, 2002), ein saurer Anionen-Farbstoff, der leicht an Proteine bindet, ermöglicht eine Unterscheidung von lebenden und toten Zellen und damit eine Bestimmung der Lebendzellzahl. Trypanblau wird von toten Zellen sofort aufgenommen, was zu einer Blaufärbung des Zytoplasmas führt. Dagegen ist die Zellmembran lebender Zellen für diesen Farbstoff für 5-10min impermeabel.

Zur Ermittlung der Zellzahl 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, die sich in einem Großquadrat (bestehend aus 25 Kleinquadraten) befanden, erfolgte die Berechnung der Zellzahl pro ml nach der Formel:

$$ZZ/ml = N/n \times V \times 10^4$$

Mit ZZ: Zellzahl, N: Zahl der gezählten Zellen, n: Zahl der ausgezählten Großquadrate, V: Verdünnungsfaktor, 10^4 : Kammerfaktor

2.4.3 Anlage von Murinen Embryofetalen Fibroblasten

Trypsin/EDTA pH 6.4:

Trypsin (Nr. 37290.02, Serva, Mannheim)				1,25	g
EDTA×2H ₂ O	3,4	mM	372,24	g	mol ⁻¹
				mit PBS ad	1000 ml

pH-Wert mit 1M NaOH auf 6,4 einstellen und anschließend steril filtrieren, die Lösung ist bei 4 °C mehrere Monate haltbar.

Medium: MEM + 5% (v/v) FCS

Einfriermedium: (siehe 2.4.1)

Einer trächtigen BALB/c Maus (ca. Tag 17) wurden die Föten steril entnommen und sofort in eine Petrischale auf Eis gestellt. Nach Entfernen der inneren Organe, der Augenanlagen und des Gehirns wurde das verbleibende Gewebe mit einer sterilen Schere oder 2 Skalpelln möglichst fein zerkleinert. Der Gewebebrei wurde in kaltem PBS aufgenommen und auf ein steriles Metallsieb überführt, um vorhandene Erythrozyten durch wiederholtes Waschen mit PBS zu entfernen. Der Gewebebrei wurde dann mit Hilfe eines Löffels in einen sterilen 300ml Erlenmeyerkolben (mit Glaskugeln Ø 1-2mm und Magnetstab) überführt. Anschließend wurde der Gewebesuspension 15ml Trypsin/EDTA und 15ml PBS zugegeben und diese für 30min bei 37°C vorsichtig gerührt. In Folge wurde noch 2mal mit je 30ml Trypsin/EDTA/PBS-Lösung jeweils für 30min bei 37°C weitergerührt. Danach wurde der Überstand mit einer Pipette abgenommen, über ein Zellsieb (100µm Nylon, Falcon) in ein 50ml Zentrifugenröhrchen überführt und 10min bei 758×g pelletiert. Das Pellet wurde in ca. 10ml Medium aufgenommen und erneut zentrifugiert. Danach wurde der Überstand dekantiert, das Pellet in 10ml Medium resuspendiert, noch ein weiteres Mal über ein Zellsieb gereinigt und anschließend die Zellzahl bestimmt.

Die Aussaat der Primärzellen erfolgte in Petrischalen (Ø 14,5cm) in einer Dichte von $2-3 \times 10^7$ Zellen pro 30ml (0. Passage). Am folgenden Tag wurden die Zellen zur Entfernung noch vorhandener Erythrozyten 3mal mit 10ml PBS vorsichtig gespült und danach mit 30ml frischem Medium überschichtet. Die Zellen wurden nach weiteren 3-6 Tagen, bei Erreichen der Konfluenz,

abgeerntet und entweder in Einfriermedium eingefroren (3-4 Aliquots/Ø 14,5cm Petrischale) oder durch Teilen (1:3 oder 1:4) in die 1. Passage überführt. Dazu wurden die MEF 1mal mit PBS gewaschen und danach mit 3ml Trypsin/EDTA-Lösung bei 37°C inkubiert, bis sich die Zellen ablösten (optische Kontrolle unter dem Invertmikroskop). Die Zellsuspension wurde in Medium aufgenommen und in neuen Kulturschalen ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz konnten die MEF in der 1. Passage weggefroren oder durch Teilen in die 2. Passage überführt werden. Um vergleichbare Bedingungen für die Infektion und den Infektionsverlauf zu gewährleisten, wurden MEF nur bis zur 2. oder 3. Passage verwendet.

2.4.4 Transfektion von Säugerzellen mit Dendrimeren

Dendrimere (z.B. PolyFect) besitzen eine sphärische Struktur mit von einem zentralen Kern ausgehenden Verzweigungen aus Polyamido-Aminpolymeren, die durch positiv geladene Aminosäuren terminiert werden. Die Plasmid-DNA wird von den polykationischen Dendrimeren gebunden und stark kondensiert. DNA-Dendrimer-Komplexe besitzen eine kompakte Struktur mit einem Durchmesser von 50-200nm. Diese Komplexe werden von den Zellen wahrscheinlich durch Phagozytose aufgenommen und in Endosomen eingeschlossen. Dort vermindern die Dendrimere durch ihre Pufferwirkung den hydrolytischen Abbau der Plasmid-DNA durch lysosomale Nukleasen (Tang et al., 1996; Tang und Szoka 1997). Dies führt zur Stabilisierung der DNA-Dendrimer-Komplexe und stellt somit den Transport von intakter DNA zum Zellkern sicher.

2.4.4.1 Transfektion von BAC-Plasmid-DNA

Medium: MEM + 5% (v/v) FCS

Zur Herstellung rekombinanter Viren wurden unterschiedliche Volumina $x=$ (5, 10, 15, 20 μ l) an gereinigter BAC-DNA (siehe 2.10.2.2) mit Hilfe des PolyFect-Reagenz (QIAGEN, Hilden) in 50-70% konfluente MEF transfiziert.

Alle folgenden Angaben beziehen sich auf ein *Well* einer 6-*Well*-Platte.

Dazu wurden $x\mu$ l BAC-DNA (abgeschnittene Pipettenspitzen zur Verringerung von Scherkräften) mit nicht-supplementiertem Medium auf ein Volumen von 100 μ l eingestellt und vorsichtig durch mehrmaliges Invertieren des Reaktionsgefäßes mit der Hand gemischt. Anschließend wurde 10 μ l PolyFect-Reagenz hinzu getropft, vorsichtig gemischt und zur Komplexbildung 10min bei 20-22°C inkubiert. Zwischenzeitlich wurden die Zellen mit 2ml 1xPBS gewaschen und dann mit 1,5ml frischem Medium überschichtet. Im Anschluss an die zehnmütige Inkubation wurde der Transfektionsansatz vorsichtig mit 600 μ l frischem Medium gemischt und mit einer abgeschnittenen Spitze gleichmäßig auf die Zellen getropft. Nach 5-6h Inkubation der Zellen bei 37°C wurde der Transfektionsansatz abgenommen, die Zellen 1x mit frischem Medium gewaschen und dann mit

3ml frischem Medium überschichtet. Die Zellen wurden bis zu 7 Tage bei 37°C weiter inkubiert. Bei einer erfolgreichen Transfektion traten erste Plaques nach 4-5 Tagen auf. Konnten bis zu Tag 7 keine Plaques erkannt werden, wurde der Versuch abgebrochen. Die Überstände der *Wells* mit Plaques wurden einzeln abgenommen und zur Entfernung von Zelltrümmern zentrifugiert (5min 2000upm, Heraeus Labofuge 400R, 4°C). Danach wurden die Virusüberstände entweder zur Entfernung der BAC-Sequenz (siehe 2.7.3) weiter passagiert oder bei -70°C gelagert.

Bemerkung:

- Um DNA Schädigungen durch starke Scherkräfte zu vermeiden, wurden nur abgeschnittene Spitzen verwendet.
- Aufgrund der hohen Viskosität der BAC-DNA ist keine photometrische DNA-Mengen-Bestimmung möglich, deshalb wurden definierte Volumina BAC-DNA eingesetzt.

2.4.4.2 Co-Transfektion von Plasmid-DNA für Dual-Luciferase Reporter Assay

Medium: DMEM + 10% (v/v) NCS

Starving-Medium: DMEM + 0,5% (v/v) NCS

Plasmide: Reporter Gen Plasmide (pGL3R2 1.5 oder pTLG, siehe 2.8.3)
IE1-Expressions-Plasmide (pIE100/1 bzw. pIE1-Mut, siehe 2.8.3)
Transfektions-Kontroll-Plasmid (pRL-TK, siehe 2.8.3)
Negativ-Kontrolle (pUC19, siehe 2.8.3)

Die nachfolgenden Angaben beziehen sich auf 2×10^5 Zellen einer Kulturschale (\varnothing 6cm), welche einen Tag zuvor frisch ausgesät wurden. Für die Transfektion wurde ebenfalls PolyFect-Reagenz (siehe 2.4.4) verwendet.

Dazu wurden $x \mu\text{l}$ pGL3R2 1.5 oder pTLG (2,5 μg), $x \mu\text{l}$ pIE100/1 bzw. pIE1-Mut oder pUC19 (2,5 μg) sowie pRL-TK (20ng) mit nicht-supplementiertem Medium auf ein Volumen von 150 μl eingestellt und durch mehrmaliges Invertieren des Reaktionsgefäßes mit der Hand gemischt. Anschließend wurde 15 μl PolyFect-Reagenz hinzu getropft, vorsichtig durch 5maliges Pipettieren gemischt und zur Komplexbildung 10min bei 20-22°C inkubiert. Währenddessen wurden die Zellen mit 4ml 1xPBS gewaschen und dann mit 3ml frischem Medium (ab hier supplementiertes Medium) überschichtet. Im Anschluss an die zehnmünütige Inkubation wurde der Transfektionsansatz vorsichtig mit 1ml frischem Medium gemischt und gleichmäßig auf die Zellen getropft. Nach 5-6h Inkubation der Zellen bei 37°C wurde der Transfektionsansatz abgenommen, die Zellen 1x mit frischem Medium gewaschen und dann mit 3ml frischem Medium überschichtet. Zur Arretierung der transfizierten Zellen in der G0/G1 Phase wurde am nächsten Tag das Medium entfernt. Die

Zellen wurden dann 3x mit 4ml frischem *Starving*-Medium gewaschen, mit 3ml frischem *Starving*-Medium überschichtet und danach für exakt 48h bei 37°C im Brutschrank weiter inkubiert.

2.4.5 Dual Luciferase Reportergen (DLR)-Assay

Dual-Luciferase® Reporter-Assay-System: (Nr. E1910, Promega)

1xPassive Lysis Buffer (PLB):

5xPLB 1:5 mit H₂O_{reinst.} verdünnen, Lagerung bei 4°C ≤ 1 Monat; Lagerung von 5xPLB bei -20°C ≤ 1 Jahr.

Luciferase-Assay-Reagent (LAR II):

Lyophilisiertes LAR II in 10ml Assay Buffer II lösen und aliquotiert (1ml Aliquots für 10 Assays) bei -70°C lagern (≤ 1 Jahr).

1xStop & Glo Reagent (für 10 Messungen):

20µl 50xStop & Glo Substrat mit 1000µl Stop & Glo Buffer verdünnen. Immer frisch ansetzen.

Drei Tage nach Transfektion wurde das *Starving*-Medium abgesaugt und wurden die transfizierten Zellen einmal mit 4ml 1xPBS gewaschen (alle nachfolgenden Schritte erfolgten bei 4°C auf Eis). Danach wurden die Zellen in 400µl 1xPLB lysiert und noch adhärenente Zellen mit einem sterilen Zellschaber abgelöst. Um die Zellyse zu beschleunigen wurde die Zellsuspension mehrmals auf- und ab-pipettiert und dann in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt (an dieser Stelle ist eine Lagerung der Proben bei -70°C möglich). Anschließend wurde die Zellsuspension mit 13000upm (centrifuge 5417R, Eppendorf) bei 4°C für 3min pelletiert und das Pellet mit dem Überstand (Bemerkung: Dies war essentiell, da dieses Protokoll gegenüber dem Original-Protokoll verkürzt wurde und die Proteinmenge im Überstand alleine eventuell zu gering ist) resuspendiert. Für den DLR-Assay wurden 100µl LARII in einem Messröhrchen (FACS Röhrchen) vorgelegt und mit 20µl resuspendiertem Zellpellet vermischt. Zuerst musste das Lumineszenz-Signal der *Firefly* Luciferase, bestimmt als *relative luminescence units* (RLU^{FL}), mit einem *Single-sample* Luminometer (Lumat LB 9507; Berthold, Bad Wildbad) gemessen werden. Nach Zugabe von 100µl 1xStop & Glo Reagent konnte die Messung des Lumineszenz-Signal der Renilla Luciferase (RLU^{RL}) erfolgen.

2.5 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden ausschließlich weibliche Mäuse des Inzuchtstammes 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 (*Specified Pathogen Free*) Bedingungen

gezüchtet wurden. Alle tierexperimentellen Arbeiten erfolgten mit der Genehmigung der Bezirksregierung Rheinhausen-Pfalz (Genehmigungsnummer 1.5 177-07/021-28).

2.6 Tierexperimentelle Methoden

2.6.1 Intraplantare Infektion der BALB/c Maus

Dazu wurde ein Virusstock des mCMV auf eine Konzentration von 2×10^5 PFU in 25 μ l PBS eingestellt, um Verluste an Infektionslösung bei der Infektion auszugleichen. Die tatsächliche Infektionsdosis bei Applikation von 25 μ l betrug demnach etwa 1×10^5 bis maximal 2×10^5 PFU pro Tier. Das Virus wurde stets auf Eis gehalten und den Mäusen mit einer 1ml Spritze und Kanülen (0,4 \times 19mm) intraplantar in die rechte Hinterpfote injiziert. Immunsupprimierte Tiere zeigten nach etwa 7 Tagen eine deutliche Hämorrhagie und lokale Schwellung an der Hinterpfote. Dagegen war bei immunkompetenten Tieren die Schwellung deutlich geringer oder kaum feststellbar.

2.6.2 Immunsuppression

Zur Untersuchung der *in vivo*-Replikation rekombinanter mCMV wurden 8-10 Wochen alte weibliche BALB/c Mäuse in einer Kleintierbestrahlungsanlage (OB58, mit zwei ^{137}Cs -Strahlungsquellen, Buchler, Braunschweig) mit einer Dosis von 6-7Gy bestrahlt. Die Dosis musste monatlich entsprechend der Halbwertszeit von ^{137}Cs ($T_{1/2}=30\text{a}$) und der Aktivität zum Zeitpunkt T_0 ($A_0=0,708 \text{ Gy/min}$) mit Hilfe des Zerfallsgesetzes ($A_t = A_0 \times e^{-\lambda t}$) neu berechnet werden. Die γ -Bestrahlung führt zu einer Aplasie des Knochenmarks durch Auslöschung hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen (Mutter et al., 1988).

2.6.3 Organentnahme und Probenkonservierung

Nach Tötung der Tiere mit CO_2 oder durch zervikale Dislokation wurden Pfote, Milz, Lymphknoten und Leber entnommen und je nach Fragestellung weiter behandelt.

2.7 Virologische Methoden

2.7.1 mCMV-Produktion

Virus-Standard-Puffer (VSP):

Tris	50	mM	121,1	g mol ⁻¹	6,1	g
EDTA×2H ₂ O	5	mM	372,24	g mol ⁻¹	1,86	g
KCl	12	mM	74,6	g mol ⁻¹	0,895	g
					mit H ₂ O _{demin.} ad	1000 ml

Lösung mit HCl 25% (v/v) auf pH 7,8 einstellen und anschließend autoklavieren.

VSP 15% (w/v) Saccharose:

Saccharose	15%	(w/v)			30	g
					mit VSP ad	200 ml

Lösung immer frisch ansetzen und anschließend steriltrieren, bei 4°C 2-3 Tage haltbar.

Medium: MEM + 5% (v/v) FCS

Zur Produktion von gereinigtem mCMV benötigt man 40 bis 50 Petrischalen (Ø 14,5cm), welche mit MEF der 2. Passage fast konfluent bewachsen sind. Diese wurden mit 1×10^5 PFU mCMV pro Petrischale infiziert. Dazu wurde das Medium abgesaugt und das Virus in einem Volumen von 5ml pro Petrischale auf die Zellen pipettiert. Das Inokulum wurde dann für ca. 30min bei 20-22°C unter mehrmaligem Schwenken inkubiert und anschließend wurden 20ml frisches Medium zugegeben. Die infizierten MEF wurden für 4-5 Tage inkubiert, dann waren die Zellen maximal infiziert, d.h. mindestens 80% der Zellen waren abgekugelt und befanden sich bereits im Überstand. Die noch adhären Zellen wurden mit einem sterilen Zellschaber abgelöst und zusammen mit dem Überstand in sterilen 500ml Zentrifugenbechern gesammelt. Anschließend wurden die Zellen für 20min mit $6370 \times g$ bei 4°C (Sorvall RC 5C Plus, Rotor SLA-3000) abzentrifugiert. Ab diesem Zeitraum erfolgten alle Aufarbeitungsschritte bei 4°C bzw. auf Eis!

Die Überstände wurden in sterilen 250ml Zentrifugenbechern gesammelt. Danach wurden die Pellets in 10ml kaltem Medium resuspendiert und homogenisiert, wobei der Stempel des *Dounce*-Homogenisators mindestens 25mal auf und ab bewegt werden musste, um eine ausreichende Homogenisierung zu erreichen. Anschließend wurde das Homogenat in sterile 50ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 20min mit $3670 \times g$ bei 4°C (RC 5C Plus, Rotor SS-34) zentrifugiert und der Überstand mit den bereits gesammelten Überständen in den 250ml Zentrifugenbechern vereinigt. Die überwiegend aus Zelltrümmern bestehenden Pellets wurden verworfen. Danach wurde für 3h bei $28000 \times g$ und 4°C (RC 5C Plus, Rotor SLA-1500) zentrifugiert, der Überstand vorsichtig dekantiert und die Pellets zum Lösen ün auf Eis (im Kühlraum) gestellt.

Am nächsten Tag wurden die Pellets im verbliebenen Medium resuspendiert und homogenisiert (s. o.). Im Anschluss wurde das Homogenat vorsichtig auf ein kaltes 15%iges (w/v) Saccharose/VSP-Kissen (36ml UZ-Röhrchen) in einem Puffer zu Virus Verhältnis von 9:1, gegeben und für 1h mit 52800×g bei 4°C (Sorvall Combi Plus, Rotor AH-629, Accel=1, nach 1h abstoppen und Accel=5 einstellen) zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgenommen, das Pellet mit 2-4ml eiskaltem Saccharose/VSP überschichtet und zum Lösen für 2-4h auf Eis gestellt. Dann wurde das Pellet sorgfältig resuspendiert, nochmals auf Eis homogenisiert und in Aliquots à 20-100µl bei -70°C eingefroren. Der Titer der gereinigten Virusstocksuspension wurde nachfolgend bestimmt.

Bemerkung:

Gereinigtes Virus kann unverdünnt bis zu 3mal aufgetaut werden, ohne dass der Virustiter abnimmt. Virusverdünnungen sollten dagegen nicht wieder eingefroren werden. Bei 4°C sind Verdünnungen bis zu 2 Tagen ohne Titerverlust lagerbar, nach 2 Wochen beträgt der Virustiter nur noch ca. 50%.

2.7.2 mCMV-Titerbestimmung

Medium: MEM + 5% (v/v) FCS

Methylzellulose-Medium: (siehe 2.3.1)

Die produktive mCMV-Infektion kann *in vitro* in MEF-Kulturen nachgewiesen werden. Zur Bestimmung des Virustiters wurden MEF der 2. Passage in 48-Well-Kulturplatten angelegt und mit unterschiedlichen Verdünnungen der zu titrierenden Virussuspension infiziert.

Dazu wurden \log_{10} Verdünnungen (6-8 Verdünnungsstufen) des gereinigten Virusstocks, ausgehend von 50µl Virussuspension (z. B. jeweils 50µl zu 450µl), in kaltem Medium in sterilen Eppendorf-Reaktionsgefäßen auf Eis durchgeführt. Für eine korrekte Titration sind sorgfältiges Mischen und Wechseln der Pipettenspitzen vor jedem neuen Pipettierschritt zwingend erforderlich. Das Medium aus den konfluenten MEF-Kulturen wurde abgesaugt. Je 100µl jeder Verdünnungsstufe wurden als Duplikat bzw. Triplikat auf die 48-Loch-Kulturplatte gegeben, anschließend 1h bei 37°C inkubiert, dann mit jeweils 500µl Methylzellulose-Medium überschichtet und für 4 - 5 Tage inkubiert. Die entstanden Plaques wurden mittels eines Invertmikroskops ausgezählt und der Virustiter nach folgender Formel berechnet:

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

Nach Mittelung der Duplikate bzw. Triplikate entsprechen die errechneten Werte dem Virustiter pro ml (Reddehase et al., 1985).

2.7.3 Eliminierung von BAC-Sequenzen aus rekombinanten mCMV

<u>Medium:</u>	MEM + 5% (v/v) FCS
<u>Infektionslösung:</u>	1µl Virusüberstand + 999µl Medium
<u>Methylzellulose-Medium:</u>	(siehe 2.3.1)
<u>BAC-Oligonukleotide und Sonde:</u>	(siehe 2.8.1.2)

Zur weiteren Charakterisierung von Virus-Mutanten, welche mittels BAC-Technologie generiert wurden, ist es wichtig, dass zuvor die BAC-Vektor-Sequenzen aus dem viralen Genom eliminiert werden. Verbleibende BAC-Sequenzen können zu veränderten biologischen Eigenschaften der rekombinanten Viren im Vergleich zum Wildtyp führen (Wagner et al., 1999; Adler et al., 2001). Im mCMV-BAC-Plasmid sind die BAC-Vektor-Sequenzen von homologen viralen-Sequenzen flankiert. Nach Transfektion des BAC-Plasmids in eukaryotische Zellen bewirkt der zelluläre Rekombinations-Apparat eine vollständige Deletion der BAC-Vektor-Sequenzen durch homologe Rekombination über die flankierenden homologen viralen Sequenzbereiche. Daraus resultiert ein authentisches WT-mCMV-Genom frei von BAC-Vektor-Sequenzen (Wagner et al., 1999). Es werden allerdings mehrere Zellkultur-Passagen (4-5) benötigt, um rekombinante mCMV von noch vorhandener BAC-DNA zu befreien.

Das Passagieren des Virusüberstandes erfolgte ausschließlich in 6-Well-Zellkulturplatten. Dazu wurde der Virusüberstand in 15ml Reaktionsgefäßen gesammelt und durch Zentrifugation (5min 2000upm, Heraeus Labofuge 400R, Rotor 8172, 4°C) von Zelltrümmern befreit. Von diesem Virusüberstand wurde jeweils 1µl zur Infektion neuer sub-konfluenter MEF eingesetzt und das restliche Volumen als *Backup* bei -70°C gelagert. Zur Infektion wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen wurden mit 1000µl Infektionslösung bedeckt. Anschließend wurde für ca. 30min bei 20-22°C unter gelegentlichem Schwenken inkubiert, dann mit jeweils 2ml Medium überschichtet und für 4-5 Tage weiter inkubiert. Auf diese Weise wurden 2 Virus-Passagen durchgeführt. Das Inokulum der 3. Passage wurde mit 2ml Methylzellulose-Medium überschichtet, um nach 3-5 Tagen einzelne Virus-Plaques isolieren zu können. Dazu wurden einzeln lokalisierte Plaqueränder auf der Unterseite der Kulturplatte unter dem Mikroskop mit einem Stift umfahren, um die so markierten Plaqueränder anschließend unter sterilen Bedingungen „picken“ zu können. Die Plaqueränder wurden mit sterilen, abgeschnittenen 1ml Pipettenspitzen gepickt und in 1000µl Medium resuspendiert. Im Anschluss daran wurden MEF mit dieser Virussuspension wie oben beschrieben infiziert. Nach 4-5 Tagen wurden die Überstände gesammelt, abzentrifugiert und auf 3 Eppendorfreaktionsgefäße verteilt. Davon diente ein Aliquot zur Isolierung viraler DNA (siehe 2.10.3.2), die beiden anderen wurden ebenfalls als *Backup* bei -70°C gelagert. Zur Überprüfung rekombinanter mCMVs auf eventuell noch verbleibende BAC-Sequenzen wurde eine PCR (siehe 2.10.4) mit BAC-spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt, die Amplifikate geblottet (siehe 2.10.5) und mit einer spezifischen BAC-Sonde (siehe 2.8.1.2) hybridisiert. Konnten nach der

Autoradiographie keine Signale detektiert werden, so wurde das jeweilige rekombinante mCMV als BAC-frei definiert.

2.8 Molekularbiologische Materialien

2.8.1 Oligonukleotide

Bemerkung:

- Positionsangaben für mCMV-Sequenzen nach Rawlinson et al., 1996.
- Sequenzier-Oligonukleotide waren bereits am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRD-800 markiert.

2.8.1.1 Sequenzier-Oligonukleotide

IE1-Sequenzen

IE1-ex4F1-IR 5'n181245-181224; 5'GAG CGT TCT GTT GTC CTG TAA G 3'

IE1ex4R1-IR 5'n180697-180718; 5'ACT GCC TTA GCC AGA TTC TCC C-3'

m164-Sequenzen

m164-seq-for 5'n223037-223016; 5'GTG TGC GAC ATC GAC CAT GTG 3'

m164-seq-rev 5'n222581-222601; 5'GCT CCA ACT GAC AGT CGC AGC 3'

m164-seq-3'HA-for 5'n222564-222543; 5'CGT GGT GAT GCT GTG TAT TAC C 3'

m164-seq-3'HA-rev 5'n222048-222068; 5'CGT TTA TCA GAA GCG AGG TTG 3'

BACm164HANm165for 5'n223682-223704; 5'GGT GCT TCT CCT GCC AGA TCT TG 3'

BACm164HANm164rev 5'n223456-223489; 5'GGT CTT CTG GAA GAG GTC GGT ACA C 3'

2.8.1.2 PCR-Oligonukleotide

Generierung von PCR-Fragmenten zur Sequenzierung

IE1ex2A 5'n181777-181756; 5'TTT TTA GAG AGA TGG AGC CCG C-3'

IE1ex4 5'n180697-180717; 5'ACT GCC TTA GCC AGA TTC TCC-3'

Amplifikatgröße: 1081bp

m164Exprfor	5'n223665-223640 5'AAA A <u>CTGCA</u> [∇] G CA CAC GTG GGA AGG CGA TGT TTC TCC 3' <i>PstI</i>
m164Exprrev	5'n222362-222388 5'AAA A <u>G</u> [∇] <u>ATC</u> CAG AAT CAT GAC GAA CGT CCG ACG CGC G 3' <i>BamHI</i> <i>Amplifikatgröße: 1304bp</i>

PCR-Oligonukleotide für die gerichtete PCR-Mutagenese mittels Kombinations-PCR

Bemerkung:

Aminosäure-Austausche sind im Vergleich zur WT-mCMV-Sequenz fett dargestellt.

Nona-Ala-for	5'n181038-181017; 5'CTT CAT GCC CAC TAA T <u>GCA</u> GG G 3' <i>L→A</i>
Nona-Ala-rev	5'n181017-181038; 5'CCC <u>TGC</u> ATT AGT GGG CAT GAA G 3' <i>L→A</i>
IE1ex2A	5'n181777-181756; 5'TTT TTA GAG AGA TGG AGC CCG C-3'
IE1ex4	5'n180697-180717; 5'ACT GCC TTA GCC AGA TTC TCC-3'
Nona-Leu-for*	5'n181038-181017; 5'CTT CAT GCC CAC TAA T <u>CTT</u> GG G 3' <i>A→L*</i>
Nona-Leu-rev*	5'n181017-181038; 5'CCC <u>AAG</u> ATT AGT GGG CAT GAA G 3' <i>A→L*</i>
forIE1phe	5'n181035-181005 5'CAT GCC CAC TAA T <u>TTC</u> GG GCC CTC AGA AAA G 3' <i>A→F</i>
revIE1phe	5'n181005-181035 5'CTT TTC TGA GGG CCC <u>GAA</u> ATT AGT GGG CAT G 3' <i>A→F</i>
m164Ala-for	5'n222868-222845; 5'GGT ACT CGC GC <u>GCC</u> T TCT GGG CCG 3' <i>I→A</i>
m164Ala-rev	5'222845-222868; 5'CGG CCC AGA A <u>GGC</u> GC GCG AGT ACC 3' <i>I→A</i>
forIE1revert	5'n181968-181943; 5'CAC AGA GGA TTC TGT CTG TGT CAA GG 3'
revIE1revert	5'n180313-180338; 5'ATC TCC TGC TGC TGT TGC TGT TCT TC 3'
m164Mut-for	5'n223745-223721; 5'CCT GAC CGG CGA TCT GCT GGT CCC G 3'
m164Mut-rev	5'n222376-222400; 5'CGT CCG ACG CGC GAC GAA GCG TTC G 3'

Apal-PTHrP-7neu 5' TAT A GG GCC[▽]C GC TGT GTC TGA ACA TCA GCT 3'
Apal

GenBank Accession No.: M60056; n'126-145

Xbal-rcPTHrP-8neu 5' TTA A T[▽]CTAGA CT TTG TAC GTC TCC ACC TTG 3'
Xbal

GenBank Accession No.: M60056; n'344-363

Amplifikatgröße: 238bp

TdyGene_for1 5' AAA A GG GCC[▽]C TG GGA CTG GTG ACA ATT GTC 3'
Apal

GenBank Accession No.: 287804; n'70-89

TdyGene_rev1 5' AAA A GG GCC[▽]C AG TAC AGG TGT GCA GCT CTA C 3'
Apal

GenBank Accession No.: 287804; n'470-450

Amplifikatgröße: 401bp

Nachweis von BAC-Sequenz

bac-b 5' GCC CGC CTG ATG AAT GCT C 3' (Ghazal, et al., 2003)

EcoR1-g 5' GGA TAC TCA GCG GCA GTT TGC 3' (Ghazal, et al., 2003)

flank-f 5' GGT TAC TGG ATG GGT ACG AG 3' (Ghazal, et al., 2003)

BAC-Sonde gleiche Sequenz wie EcoR1-g

LightCycler- bzw. TaqMan-Oligonukleotide (Simon et. al., 2005a)

LCPTHrP_1♦ *GenBank Accession No.:* M60056; n'327-307

5' GGT ATC TGC CCT CAT CGT CTG 3'

LCPTHrP_2♦ *GenBank Accession No.:* M60056; n'186-206

5' CGT TTC TTC CTC CAC CAT CTG 3'

Amplifikatgröße: 142bp

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: 135bp

2.8.2 Bakterienstämme

Die meisten Arbeiten wurden mit dem Wirtsstamm DH5 α durchgeführt. Im Zusammenhang mit dem mCMV-BAC-WT-Plasmid (C3X) wurde immer der Wirtsstamm DH10B verwendet, da dieser in besonderem Maße für die Transformation und Propagierung von großen bis sehr großen Plasmiden geeignet (Sheng et al., 1995; Donahue and Bloom, 1998) und RecA negativ ist.

DH5α: (Invitrogen)	Genotyp:	F ⁻ ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ lacZYA-argF) U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) <i>phoA supE44 λ⁻ thi-1 gyrA96 relA1</i>
DH10B: (Invitrogen)	Genotyp:	F ⁻ <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ lacX74 <i>deoR recA1 endA1 araΔ139 Δ(ara, leu)7697 galJ galλ⁻ rpsL nupGλ⁻</i>
TG1: (Stratagene)	Genotyp:	<i>supE thi-1 Δ(lac-proAB) (mcrB-hsdSM)5</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) [F' <i>traD36 proAB lacI^qZΔM15</i>]
GM2163 (NEB)	Genotyp:	F ⁻ <i>ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 galK2 galT22 mcrA dcm-6 hisG4 rfbD1 rpsL 136(Str^R) dam13::Tn19(Cam^R) xylA5 mtl-1 thi-1 mcrB1 hsdR2</i> (keine DNA Methylierung!)
PIR1 (Invitrogen)	Genotyp:	F ⁻ Δ lac169 <i>rpoS(Am) robA1 creC510 hsdR514 endA recA1 uidA(ΔMluI)::pir-116</i> (pir codiert für das Replikationsprotein π ; dies ermöglicht die Replikation über den R6K γ Origin)

2.8.3 Vektorsysteme

Vektor	Größe	Resistenzen / Bemerkungen	Verwendung
pUC19*, Anzucht 37°C	2686bp	<i>Amp^{Res}</i> , α -Comp.	Subklonierungen
<i>Phagmid pBluescript II KS*</i> , Anzucht 37°C	2961bp	<i>Amp^{Res}</i> , α -Comp.	Klonierungen, Subklonierungen (Stratagene)
pIE100/1*, Anzucht 37°C		<i>Amp^{Res}</i>	IE1-Expressionsplasmid (Messerle et al., 1992)
pTLG*, Anzucht 37°C		Firefly Luciferase, <i>Amp^{Res}</i>	TS Promotor vor Firefly Luciferase (Gribaudo et al., 2000)
pGL3R2 1.5*, Anzucht 37°C		Firefly Luciferase, <i>Amp^{Res}</i>	RNR Promotor vor Firefly Luciferase (Lembo et al., 2000)
pRL-TK*, Anzucht 37°C		Renilla Luciferase, <i>Amp^{Res}</i>	Transfektions-Kontrolle Dual Luciferase Reportergen Assay (Promega)
<i>pDrive Cloning Vector*</i> , Anzucht 37°C	3851bp	<i>Amp^{Res}</i> , <i>Kan^{Res}</i> , α -Comp.	Klonierung von PCR-Fragmenten mit A-Überhängen (QIAGEN)
pACYC177, Anzucht 30°C	3941bp	<i>Amp^{Res}</i> , <i>Kan^{Res}</i>	<i>Hind</i> III-Bibliothek von WT-mCMV (Ebeling et al., 1983)
pACYC184, Anzucht 30°C	4245bp	<i>Amp^{Res}</i> , <i>Kan^{Res}</i>	<i>Hind</i> III-E'-Fragment von mCMV K181 (Mercer et al., 1983)
pKD46, Anzucht 30°C	6329bp	<i>Amp^{Res}</i> , pSC101 <i>ori</i> , RepA ts, red $\alpha\beta\gamma$	Mit L-Arabinose induzierbare Expression der Red-Proteine (Datsenko und Wanner, 2000)
pCP20, Anzucht 30°C	9400bp	<i>Cam^{Res}</i> , <i>Amp^{Res}</i> , pSC101 <i>ori</i> , RepA ts,	Expressionsplasmid für FLP-Rekombinase (Cherepanov und Wackernagel, 1995)
pGP704-Kan*, Anzucht 37°C	~4700bp	<i>Amp^{Res}</i> , π -abhängige Replikation über R6K γ <i>ori</i> , wächst nur in PIR1 <i>E. coli</i> , <i>Kan^{Res}</i> flankiert von zwei FRT-Sites	PCR- <i>Template</i> für mCMV-Mutanten, nach Transformation kein Hintergrund, da π -abhängiges Wachstum
pST76K_SR, Anzucht 30°C	6326bp	<i>Kan^{Res}</i> , <i>SacB</i> , pSC101 <i>ori</i> , RepA ts, <i>RecA</i>	<i>Shuttle</i> -Plasmid für Rekombinanten Herstellung (Pósfai et al., 1997; Borst et al., 2004)
mCMV-BAC-WT-Plasmid (C3X-Plasmid), Anzucht 37°C	238674bp	<i>Cam^{Res}</i>	Enthält ein vollständiges mCMV-Genom (Wagner et al., 1999)

Tab. 2.2. Auflistung der verwendeten Vektorsysteme. *High copy* Vektoren sind mit Sternchen (*) gekennzeichnet

2.9 Molekularbiologische Standardmethoden

2.9.1 Phenolische DNA-Extraktion

<u>Roti-Phenol</u>	(v/v)	Phenol	in TE-Puffer pH 7,5-8,0 gesättigt
<u>Roti-Phenol/Chloroform</u>	(v/v)	Phenol, Chloroform, Isoamylalkohol, 25:24:1	in TE-Puffer pH 7,5-8,0 gesättigt
<u>Chloroform</u>	(v/v)	Chloroform, Isoamylalkohol, 24:1	

TE-Puffer

Tris	10 mM	121,1 gmol ⁻¹	1,211 g
EDTA×2H ₂ O	1 mM	372,24 gmol ⁻¹	0,372 g
		mit H ₂ O _{demin.} ad	1000 ml

Lösung mit HCl (25% v/v) auf pH 8,0 einstellen und anschließend autoklavieren.

Die Phenol/Chloroform Extraktion dient zum Abtrennen von Proteinen aus nukleinsäurehaltigen Lösungen, z.B. bei der Präparation von Plasmid-DNA oder auch zum Abstoppen DNA-modifizierender Enzymreaktionen. Durch die organischen Lösungsmittel Phenol und Chloroform werden die Proteine denaturiert, die sich dann in der Interphase sammeln und anschließend präzipitiert werden können. Die Löslichkeit der Nukleinsäuren bleibt dabei unbeeinflusst (bei einem pH >7,0 befinden sich alle Nukleinsäuren in der wässrigen Phase). Die zu extrahierende Probe wurde, wenn ihr Volumen ≥100µl war direkt mit 1 Vol. Roti-Phenol versetzt, Proben ≤100µl mussten mit H₂O_{reinst.} auf 100µl aufgefüllt werden und konnten erst dann mit 1 Vol. Roti-Phenol versetzt werden. Danach wurde für 2min gevortext bzw. im Falle besonders großer DNA vorsichtig geschüttelt. Die entstandene Emulsion wurde zur Phasentrennung für mind. 5min bei maximaler Drehzahl (Centrifuge 5417R Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert und die wässrige Oberphase in ein neues Eppendorfreaktions-Gefäß überführt. Zur Erhöhung der DNA-Ausbeute konnten die verbleibenden Phasen erneut mit TE-Puffer oder H₂O_{reinst.} re-extrahiert werden. Die wässrigen Phasen wurden vereint, mit 1 Vol. Roti-Phenol/Chloroform versetzt, für 2min gevortext bzw. geschüttelt und anschließend wie oben beschrieben zentrifugiert. Eine abschließende Extraktion mit 1 Vol. Chloroform sorgte für das Entfernen letzter Phenolreste.

2.9.2 Präzipitation von Nukleinsäuren

Durch monovalente Kationen und Alkohol können Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen ausgefällt werden. Als Fällungsreagenz wird dabei häufig 1/10 Vol. 3M Na(H₃CCOO) pH 5,2 oder

5M NaCl verwendet. Sollten sich die Nucleinsäuren bereits in einer Lösung mit hoher Salzkonzentration befinden, kann auf einen weiteren Zusatz monovalenter Kationen verzichtet werden. Als Alkohol diente entweder 1 Vol. Isopropanol oder 2 Vol. 100% (v/v) Ethanol. Die Temperatur des Alkohols bzw. die Fälltemperatur und Fälldauer müssen jeweils der Probe angepasst werden. Je niedriger die Temperatur ist, desto schneller fallen die Nucleinsäuren aus; allerdings besteht dabei die Gefahr, dass Salz mit ausfällt. Eine zu kurze Präzipitation ist andererseits besonders für die Behandlung geringer DNA-Mengen kritisch. In der Regel wurde die Nucleinsäure-Probe mit Salz und -20°C kaltem Ethanol bzw. Isopropanol (20-22°C) gemischt und entweder für 30-60min bei -70°C oder 1-2h bei -20°C gefällt. Nach dem Fällen wurde für 20min bei 4°C mit 20817g (Centrifuge 5417R Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Präzipitat mit 200µl 80% (v/v) Ethanol (-20°C) gewaschen, um eventuell vorhandenes Salz zu entfernen. Danach wurde noch 1mal für 10min zentrifugiert (s. o.). Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Pellet für 15min bei 20-22°C getrocknet. Das Rücklösen der Pellets erfolgte in der Regel in einem geeigneten Vol. TE oder H₂O_{reinst.}

2.9.3 Quantifizierung von Nucleinsäure-Proben

In Abhängigkeit von der zur Verfügung stehenden Menge an Nucleinsäuren wurden verschiedene Methoden zur Quantifizierung angewandt. Standardmäßig wurde die Konzentration für RNA- und DNA-Proben spektrometrisch mit Hilfe eines Photometers (GeneQuant; Pharmacia, USA) bestimmt. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei ca. 1-2µg. Geringere Mengen (5-1000ng) konnten durch einen Fluoreszenzvergleich mit einem quantifizierbaren DNA-Marker im Agarose-Gel quantifiziert werden. In der Regel wurden 495µl TE-Puffer in einem Eppendorf-Gefäß vorgelegt, 5µl der Nucleinsäure-Probe hinzupipettiert, durchmischt und zur Bestimmung der Extinktion bei 260nm in eine Quarzküvette überführt. TE-Puffer oder 10mM Tris/HCl (pH 7,5) ist Wasser vorzuziehen, weil das Absorptionsverhalten von Nucleinsäuren in nichtgepufferten Lösungen stark variieren kann (Wilfinger et al., 1997). Den Konzentrationsberechnungen wurden folgende Richtwerte zugrunde gelegt:

Extinktion _{260nm} =1	=	50µg/ml	bei doppelsträngiger DNA
		40µg/ml	bei einzelsträngiger DNA oder RNA
		45µg/ml	bei einem Gemisch an doppelsträngiger DNA und RNA

Um zusätzlich die Reinheit der Nucleinsäure-Lösung zu überprüfen, wurde noch die Extinktion bei 280nm gemessen. Die Reinheit der Nucleinsäure-Lösung konnte an dem Quotienten E_{260}/E_{280} erkannt werden. Bei 280nm absorbieren beispielsweise aromatische Aminosäuren und Phenol. Der Quotient gab also Aufschluss darüber, inwieweit die Lösung mit Proteinen oder Phenolresten

verunreinigt war. Das Verhältnis für „reine“ DNA-Präparation sollte 1,8 und für reine RNA-Präparation $\geq 2,0$ sein (Sambrook und Russel, 2001).

2.9.4 Restriktion

Für analytische Zwecke wurden meist 200-1500ng Plasmid-DNA in 10-20 μ l Ansätzen Restriktionsenzymen verdaut. Standardmäßig wurde für diesen Zweck eine Enzymmenge von 5-20U pro Ansatz eingesetzt. Dies galt sowohl für Spaltungen, die nur für einige Stunden (1-3h), als auch für solche, die ∞ N (mindestens 12h) erfolgten. Dabei war es möglich, sofern die Reaktionsbedingungen übereinstimmten, auch Mehrfachrestriktionen gleichzeitig durchzuführen. Präparative DNA-Restriktionen, bei denen größere Mengen an DNA (1,5-20 μ g in 20-100 μ l) eingesetzt wurden, erfolgten immer ∞ N, die benötigte Enzymmenge wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Units}_{\text{Enzym}} = x \mu\text{g}_{\text{DNA}} \times \frac{\sum \text{Schnittstellen Plasmid oder Insert} \times M_{\lambda}}{\sum \text{Schnittstellen } \lambda \times M_{\text{Plasmid oder Insert}}}$$

λ , Bakteriophage Lambda; $M_{\lambda} = 48502 \text{ bp} \times 660 \text{ g mol}^{-1}$; $M_{\text{Plasmid oder Insert}} = \text{Länge in bp} \times 660 \text{ g mol}^{-1}$; x, zu schneidende DNA-Menge

Der Erfolg jeder Restriktion wurde nach Beendigung der Inkubation durch Auftrennung im Agarose-Minigel kontrolliert.

<u>Standard-Restriktionsansatz:</u>	Plasmid-DNA	x μ l (x μ g)
	10xReaktionspuffer	2 μ l
	Restriktionsenzym(e)	y μ l
	H ₂ O _{reinst.}	ad 20 μ l

2.9.5 Native Gelelektrophoresen von DNA

50xTAE-Puffer

Tris	400 mM	121,1 g mol ⁻¹	242,2 g
EDTA \times 2H ₂ O	50 mM	372,24 g mol ⁻¹	93,06 g
		mit H ₂ O _{demin.} ad	5000 ml

Lösung mit Eisessig (ca. 285ml) auf pH 8,0 einstellen und anschließend autoklavieren.

Gebrauchslösung: 1xTAE.

10×TBE-Puffer

Tris	450 mM	121,1 g mol ⁻¹	54,5 g
EDTA×2H ₂ O	10 mM	372,24 g mol ⁻¹	3,7 g
Borsäure	450 mM	61,84 g mol ⁻¹	27,8 g
		mit H ₂ O _{demin.} ad	1000 ml

Lösung (wenn nötig) mit Eisessig, auf pH 8,3 einstellen und anschließend autoklavieren.

Gebrauchslösung: 1×TBE10×Probenpuffer

67% (w/v) Saccharose

0,05% (w/v) Bromphenolblau

Mit Hilfe der nativen Gelelektrophorese wurden Größenabschätzungen von DNA-Fragmenten, Konzentrationsbestimmungen, Reinigung von linearen DNA-Fragmenten, Intaktheitsüberprüfungen und präparative Auftrennungen von Nukleinsäuren durchgeführt. Standardmäßig erfolgte die Auftrennung der DNA-Moleküle mit 1%igen Agarose-Gelen. Für bestimmte Fragestellungen mussten die Agarose-Konzentrationen variiert werden; so wurden restringierte BAC-Plasmide von 1-30kbp in 0,6%igen und DNA-Fragmente <1kbp in 2%igen Agarose-Gelen, aufgetrennt. In der Regel wurden so genannte Maxi-Gele (20×20 bzw. 20×10cm) oder Mini-Gele (10×6,5cm) verwendet. Die Mini-Gele wurden in erster Linie zur schnellen Kontrolle der DNA nach Restriktionen oder PCRs eingesetzt. Linearisierte BAC-DNA wurde immer in speziellen Maxi-Gelen (20×25cm) im Kühlraum (4°C) aufgetrennt (Gelherstellung siehe Gassen und Schimpf, 1999). Vor dem Gel-Lauf mussten die Proben mit 1/10 Vol. Probenpuffer versetzt werden, um damit ein Einsinken der Nukleinsäuren in die Geltaschen zu ermöglichen. Die Auftrennung der Proben erfolgte in horizontalen Submers-Elektrophoresekammern; als Laufpuffer diente 1×TAE. Dabei richtete sich die angelegte Spannung nach der Fragment- bzw. Gelgröße und Nukleinsäuremenge (ca. 70-130V). Die Auftrennung von BAC-Fragmenten hingegen erfolgte mit 1×TBE (höhere Pufferkapazität im Vgl. zu TAE) als Laufpuffer und dauerte mind. üN. Die Detektion der Nukleinsäuren wurde durch Interkalation von Ethidiumbromid-Molekülen ermöglicht. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel auf einen Transilluminator gelegt. Die DNA-Banden waren aufgrund einer orangeroten Fluoreszenz-Emission von Ethidiumbromid bei 560nm sichtbar. Die Dokumentation erfolgte entweder mit Hilfe einer Sofortbild-Kamera (Polaroid Land Camera MP-4 mit Polaroidfilm Typ 667, UV-Filtersystem Kodak Wratten 2A) oder einer CCD-Videokamera.

2.9.6 Elution von DNA aus Agarose-Gelen

Die Elution von DNA aus Agarose-Gelen erfolgte mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction-Kits* (Nr. 28704, QIAGEN). Dieser Kit ermöglicht eine Extraktion und Reinigung von bis zu 10µg DNA-Molekülen mit einer Größe von 70bp-10kbp ohne Phenolextraktion und anschließende Ethanol-Präzipitation. Das Prinzip der Methode beruht auf einer quantitativen Adsorption von DNA-Molekülen an eine Silica-Gel-Membran unter Hochsalz-Bedingungen; die anschließende Elution der DNA erfolgt bei Niedrigsalz-Bedingungen. Alle Verunreinigungen wie z.B. Agarose, Proteine, Salze und Ethidiumbromid werden während der einzelnen Waschschriffe entfernt. Somit kann letztendlich mit TE oder 10mM Tris/HCl (pH 8,5) reine DNA eluiert werden, die dann direkt für nachfolgende Anwendungen (z.B. Ligation, PCR, Sequenzierung, etc.) zur Verfügung steht. (Versuchsprotokoll siehe: <http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/INT/cleanlit.aspx>)

2.9.7 Reinigung von DNA

Zur schnellen Reinigung von DNA, z. B. nach Restriktionsverdau oder PCRs, wurde der *High Pure PCR Purification Kit* (Nr. 11732668001, Roche) verwendet. In Gegenwart von Guanidin Thiocyanat bindet DNA selektiv an spezielle Glasfilter. Die gebundene DNA kann durch verschiedene Waschschriffe von Oligonukleotiden, Proteinen und Salzen gereinigt werden; die Elution erfolgt schließlich unter Niedrigsalz-Bedingungen. Das Versuchsprotokoll wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt (Stand: Roche Januar 2003)

2.9.8 Dephosphorylierung linearer DNA

Um die Religation eines Vektors nach Restriktionsenzymverdau zu verhindern, ist eine Dephosphorylierung mittels alkalischer Phosphatase notwendig, welche die terminalen Phosphatgruppen am 5'-Ende entfernt. Dadurch konnte der Vektor-Hintergrund bei allen Klonierungen deutlich vermindert werden. Für die Dephosphorylierung von DNA wurde *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase* (CIP) verwendet. Pro µg DNA wurden 0,5U Enzym benötigt. Bei der Verwendung von NEB-Enzymen konnte der Restriktionsansatz direkt mit CIP versetzt und bei 37°C für 1h inkubiert werden (siehe NEB Katalog 2002-2003). Restriktionsansätze mit Enzymen anderer Hersteller mussten zuvor gereinigt und konnten erst dann mit CIP dephosphoryliert werden. Zur vollständigen Entfernung der alkalischen Phosphatase musste der gesamte Ansatz über ein präparatives Agarose-Gel (siehe 2.9.5) gereinigt und die DNA anschließend aus dem Gel eluiert (siehe 2.9.6) werden.

2.9.9 Herstellung von *blunt-ends* nach Restriktionsenzymverdau

Um die Ligation von DNA-Fragmenten mit nicht kompatiblen Enden zu ermöglichen, wurden mit dem *Large Fragment* (Klenow-Fragment) der *E. coli* DNA-Polymerase I glatte Enden erzeugt. Das Klenow-Fragment besitzt eine 5'-3'-Polymeraseaktivität und eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität. 3'-Überhänge wurden durch die Klenow-Polymerase abgebaut, indem zu der gespaltenen DNA, 1/10 Vol. Klenow-Puffer (bei der Verwendung von NEB-Enzymen nicht nötig) und 1U Enzym pro µg DNA zugegeben wurden. Nach 15-minütiger Inkubation bei 25°C wurde die Exonukleaseaktivität durch Zugabe von dNTPs gestoppt. Dies induziert gleichzeitig die Polymeraseaktivität des Klenow-Fragments, und eine weitere Inkubation für 10min bei 25°C verhindert das Zurückbleiben eines 5'-Überhanges. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 1µl 0,5M EDTA und anschließender Inkubation bei 75°C für 20min. DNA-Fragmente mit 5'-Überhängen wurden mit 250µM eines jeden dNTPs 1/10 Vol. Klenow-Puffer und 1U Klenow-Polymerase pro µg DNA für 20-30min bei 37°C inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte wie oben beschrieben. Bevor die DNA-Fragmente weiter bearbeitet werden konnten, musste zuerst die Klenow-Polymerase entfernt werden. Dazu wurde der gesamte Ansatz in einem präparativen Agarose-Gel (siehe 2.9.5) aufgetrennt und die DNA anschließend aus dem Gel eluiert (siehe 2.9.6).

2.9.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde überwiegend zur Herstellung von Subklonen für die BAC-Mutagenese verwendet, kam aber auch bei der Erstellung von Standard-Plasmiden für die quantitative *Real-Time*-PCR (qPCR) am *TaqMan* zum Einsatz. Dabei war die Menge an eingesetzter DNA von den Größenverhältnissen zwischen Vektor und Insert abhängig. Das Verhältnis der Molekülen sollte jedoch 1:1 sein. Um dies zu realisieren, wurden sowohl vom Vektor als auch vom Insert zwischen 0,5 und 1pmol dsDNA eingesetzt. Die benötigten DNA-Mengen konnten mit folgender Formel berechnet werden:

Ligationsformel:
$$\mu\text{g}_{\text{ds DNA}} = \frac{x \text{ pmol} \times N_{\text{bp}} \times 660 \mu\text{g mol}^{-1}}{1 \times 10^6}$$
 (x: pmol dsDNA; N:Anzahl Basenpaare)

In den einzelnen Ligationsansätzen variierte das Insert- zu Vektorverhältnis von 2:1 bis 5:1. Diese Ligationsverhältnisse galten sowohl für *sticky-* als auch für *blunt-ends*. Die Ansätze wurden entweder üN (mind. 16h) bei 16°C oder für 2h bei 22°C mit T4 DNA-Ligase (Invitrogen, Karlsruhe) inkubiert. Das Endvolumen der Ligationsansätze betrug entweder 10,15 oder 20µl.

<u>Standard-Ligationsansatz:</u>	Vektor-DNA	1	μl
	Insert-DNA	3	μl
	10×Ligase Puffer	1	μl
	T4 DNA-Ligase	1	μl (1U)
	H ₂ O _{reinst.}	ad 10	μl

2.9.10.1 Ligation von PCR-Fragmenten mit QIAGEN PCR Cloning Kit

Dieser Kit (Nr. 231122, QIAGEN) ermöglicht eine schnelle und effiziente Klonierung von PCR-Fragmenten, die mittels Taq- oder einer anderen *non-proofreading* DNA-Polymerase generiert werden. Dabei macht man sich zu Nutze, dass Taq-Polymerasen am 3'-Ende der PCR-Produkte A-Überhänge erzeugen. Die PCR-Amplifikate können nach einer Gelaufreinigung direkt in einen speziellen, bereits linearisierten Vektor (*pDrive Cloning Vector*, QIAGEN, siehe 2.8.3) mit 5' U-Überhängen ligiert werden. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass damit alle PCR-Produkte, die wie oben beschrieben synthetisiert werden, ohne das Einfügen von speziellen Schnittstellen für Endonukleasen direkt ligiert werden können. Von dem jeweiligem Ligationsansatz wurden, nach 10minütiger Hitzeinaktivierung bei 70°C, 1-2μl in elektrokompente Zellen elektroporiert (siehe 2.9.12.4). (Versuchsprotokoll siehe:

<http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/INT/cleanlit.aspx#qiaquickspin>).

2.9.11 Bakterienanzucht

2.9.11.1 Flüssigkulturen

LB-Medium

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

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

Antibiotika-Stammlösungen:

Ampicillin (Amp): 100mg/ml	(in H ₂ O _{reinst.} ; 1:1000, c _{End} =100μg/ml)
Tetracyclin (Tet): 12,5mg/ml	(in 50% Ethanol (v/v); 1:1000, c _{End} =12,5μg/ml)
Chloramphenicol (Cam): 34mg/ml	(in Ethanol (100%); 1:2000, c _{End} =17μg/ml)
Kanamycin (Kan): 10mg/ml	(in H ₂ O _{reinst.} , 1:400, c _{End} =25μg/ml)

Lösungen wurden sterilfiltriert und danach bei -20°C gelagert. Die Zugabe der Antibiotika erfolgte immer nach dem Autoklavieren des Mediums.

Zur Herstellung von Flüssigkulturen wurde immer nur von einer einzelnen Kolonie einer frischen Plattenkultur ausgegangen. Das Picken der einzelnen Kolonien von der Agarplatte erfolgte mit sterilen Pipettenspitzen, die dann in Kulturröhrchen, in denen sich 5ml LB-Medium bei *high-copy* Plasmiden oder 10ml LB-Medium bei *low-copy* Plasmiden (z. B. BAC-Plasmide) befand, überführt wurden. Die Anzucht erfolgte üN bei geeigneter Temperatur (siehe 2.8.3) unter Schütteln (Inkubationshaube Certomat H, Braun-Melsungen) mit 225upm. Wurden größere Mengen (>10ml) an Flüssigkultur benötigt, musste zuerst eine 5ml Vorkultur hergestellt werden. Nach 5- bis 8-stündiger Inkubation konnte dann ein größeres Volumen an Flüssigkultur mit 1/1000 Volumen der Vorkultur angeimpft werden.

2.9.11.2 Plattenkulturen

Plattenkulturen dienen dazu, Bakterienkulturen über einen Zeitraum von mehreren Tagen bis maximal 2 Wochen zu lagern, eine Selektion von Transformanten durchzuführen oder Flüssigkulturen anzupflanzen. Die Lagerung der Bakterienplatten, die zuvor mit Parafilm abgedichtet wurden, erfolgte bei 4°C. Die Plattenkulturen wurden von gut bewachsenen Übernachtskulturen (Flüssigkulturen) durch Ausstreichen mit einer Impföse angelegt. Wurden jedoch Transformationsansätze ausplattiert, erfolgte das Verteilen der Bakteriensuspension auf der Agaroberfläche mit einem Drigalski-Spatel.

Die Herstellung der Agarplatten erfolgte mit LB-Medium (siehe 2.9.11.1), welchem zusätzlich 15g Bacto-Agar pro Liter zugesetzt wurde. Die Suspension wurde anschließend autoklaviert. Erst nach Abkühlung auf ca. 40-45°C konnte der Zusatz von Antibiotikum erfolgen, danach wurde die noch flüssige Agarlösung in sterile Einweg-Plastik-Petrischalen gegossen. Die so hergestellten Agarplatten konnten dann, nach der Polymerisation des Agars, für mehrere Wochen im Kühlraum aufbewahrt werden.

2.9.11.3 Dauerkulturen

Damit Bakterienklone auch über längere Zeiträume hinweg stabil gelagert werden konnten, mussten Dauerkulturen angelegt werden. Dazu wurden 600µl einer frischen LB-Kultur in *Cryovials* überführt, mit 400µl Glycerin gemischt und anschließend bei -70°C aufbewahrt.

2.9.12 Transformation kompetenter Bakterienzellen

2.9.12.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien mit der CaCl₂-Methode

CaCl₂-Lösung

CaCl ₂ ·2H ₂ O	1M	147	g mol ⁻¹	147	g
			mit H ₂ O _{demin.} ad	1000	ml

MgCl₂-Lösung

MgCl ₂ ·6H ₂ O	1M	203,3	g mol ⁻¹	203,3	g
			mit H ₂ O _{demin.} ad	1000	ml

Lösungen anschließend autoklavieren und bei 4°C lagern.

LB-Medium (siehe 2.9.11.1)

Einfrüerlösung 0,1M CaCl₂-Lösung, 15% Glycerin (v/v)

Mit dieser Methode ist es möglich, Transformationsraten von 5×10^6 - 2×10^7 Kolonien pro μg DNA zu erreichen (Sambrook & Russel, 2001). Von einer frischen Plattenkultur wurde mit einer sterilen Pipettenspitze eine Kolonie des Wirtsstamms gepickt und in 50ml LB-Medium überführt. Besaß der verwendete Wirtsstamm eine Antibiotikaresistenz, erfolgte die Zugabe des entsprechenden Antibiotikums. Die angeimpfte Lösung wurde unter Schütteln (225upm) bei 37°C ün inkubiert. Von dieser Vorkultur wurden 20ml Bakteriensuspension entnommen und zu 480ml LB-Medium pipettiert. Danach wurden die Bakterien bis zu einer OD₆₀₀ zwischen 0,8 und 1,0 angezogen (Log-Phase, ca. 3-4h). Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten auf Eis, weiterhin wurden nur auf 4°C vorgekühlte Lösungen und Geräte verwendet. Bei den Resuspendierungsschritten wurde nicht gevortext, um starke Scherkräfte zu vermeiden.

Nach Erreichen der exponentiellen Phase wurden die Bakterien bei 6079×g und 4°C für 10min zentrifugiert (SLA 3000 Rotor; Sorvall RC5C Plus). Der klare Überstand wurde dekantiert und das Bakterienpellet in 1×Kulturvolumen (hier 500ml) 0,1M MgCl₂-Lösung resuspendiert. Danach wurden die Bakterien erneut pelletiert und nach vollständiger Resuspendierung in 1×Kulturvolumen 0,1M CaCl₂-Lösung folgte eine 1-1,5-stündige Inkubation auf Eis. Anschließend wurde die Bakteriensuspension nochmals für 5min pelletiert, in 1/10 Kulturvolumen Einfrierylösung resuspendiert, in auf Eis stehenden Eppendorf-Reaktionsgefäßen zu je 1ml aliquotiert und abschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Bakterienzellen erfolgte bei -70°C.

2.9.12.2 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

LB-Medium (siehe 2.9.11.1)

LB-Platten (siehe 2.9.11.2)

Lösung für α -Komplementationstest (Blau/Weiß Selektion)

X-Gal 20mg in DMF lösen und lichtgeschützt bei -20°C lagern; 80 μ l pro Platte, mindestens 30min vor Ausplattierung der Bakterien auftragen.

Zu Beginn wurden 150 μ l Portionen kompetenter Zellen in eisgekühlte 1,5ml Eppendorfgefäße pipettiert und mit dem gesamten Ligationsansatz vereinigt. Nach vorsichtigem Mischen der Suspension wurde der Ansatz für 30-45min auf Eis inkubiert. Die Transformationsansätze wurden für exakt 2min bei 42°C im Thermoblock hitzebehandelt und anschließend kurz auf Eis abgekühlt. Nach der Zugabe von 300-500 μ l LB-Medium wurde für 30-45min bei geeigneter Temperatur (siehe 2.8.3) unter Schütteln (200-250upm) inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension bei 2500upm (centrifuge 5417C, Eppendorf) pelletiert und der Überstand dekantiert. Das Bakterienpellet konnte mit dem restlichen LB-Medium (100-150 μ l) resuspendiert werden und wurde danach auf LB-Platten, welche das entsprechende Antibiotikum enthielten, ausplattiert. Abschließend wurde üN bei 30 bzw. 37°C im Brutschrank inkubiert.

Wenn die Möglichkeit bestand, wurde der α -Komplementationstest eingesetzt. Damit war es möglich, Klone, die kein rekombinantes Plasmid enthielten aufgrund der Blaufärbung von rekombinanten Klonen (keine Färbung) zu unterscheiden.

2.9.12.3 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

10% (v/v) Glycerin vorgekühlt 4°C

Steriles Wasser Aqua B. Braun, Ecotainer, vorgekühlt 4°C

Alle Präparationsschritte wurden, sofern nicht anders angegeben, auf Eis durchgeführt (siehe 2.9.12.1.). Von einer frischen Plattenkultur wurde eine einzelne Kolonie gepickt, in 5ml LB-Medium (siehe 2.9.12.1, ggf. mit entsprechendem Antibiotikum versetzt) überführt und unter Schütteln üN bei 37°C inkubiert. Mit je 1,25ml der üN-Vorkultur wurde 2 \times 200ml LB-Medium (ggf. mit entsprechendem Antibiotikum versetzt) angeimpft und bei 37°C unter Schütteln so lange inkubiert, bis sich eine OD₆₀₀ von 0,5-0,7 eingestellt hatte (ca. 2-2,5h). Die Bakterien wurden sofort für 15min auf Eis gestellt und danach bei 6079 \times g und 4°C für 10min zentrifugiert (SLA 3000 Rotor; Sorvall RC5C Plus). Die Überstände wurden vorsichtig dekantiert, die Pellets mit je 2,5ml eisgekühltem H₂O resuspendiert, vereinigt und zur Entfernung der Salze mit 500ml H₂O (eisgekühlt) gewaschen. Danach wurden die Bakterien erneut pelletiert, in 5ml eiskaltem 10%igen Glycerin resuspendiert und in ein vorgekühltes 15ml Falcon-Reaktionsgefäß überführt. Die Bakteriensuspension wurde nochmals für 10min bei 4°C und 3500upm (centrifuge 5417R Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Der Überstand wurde quantitativ ab-pipettiert, das Pellet in 1 \times Pelletvolumen mit eiskaltem 10%igen Glycerin auf Eis resuspendiert und in Aliquots à 50 μ l in vorgekühlte Eppendorf-

Reaktionsgefäße überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2.9.12.4 Elektrotransformation

Für die Elektroporation von elektrokompetenten Bakterien wurde die zu transformierende DNA zu einem $50\mu\text{l}$ Aliquot der Bakterien auf Eis gegeben. Um den Salzgehalt der zu transformierenden DNA insbesondere bei Ligationsansätzen gering zu halten, wurde pro Elektroporation nie mehr als 1ng Plasmid-DNA bzw. wurden Ligationsansätze immer 1:10 verdünnt eingesetzt. Die Lösung wurde in eine vorgekühlte Elektroporations-Küvette ($\varnothing 0,2\text{cm}$, BIO-RAD) überführt und mit $2,5\text{kV}$, 400Ω und 25mF perforiert (Gene Pulser, BIO-RAD, München). Nach sofortiger Zugabe von $500\mu\text{l}$ LB-Medium wurden die Bakterien 45-60min bei entsprechender Temperatur (siehe 2.8.3) unter Schütteln inkubiert und auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotika-Zusatz ausgestrichen.

2.10 Isolierung und Analyse von Nukleinsäuren

2.10.1 Plasmid Minipräparationen

2.10.1.1 Schnellpräparation von Plasmid-DNA

Lösung I

Tris	25 mM	121,1 g mol^{-1}	6,06 g
$\text{Na}_2\text{EDTA}\times 2\text{H}_2\text{O}$	10 mM	372,24 g mol^{-1}	3,72 g
		mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$ ad	1000 ml

Den pH-Wert mit konz. HCl auf 8,0 einstellen, autoklavieren und danach 100mg RNase zugeben. Lösung bei 4°C lagern.

Lösung II

NaOH	200 mM	40,01 g mol^{-1}	8 g
20% (v/v) SDS			50 ml
		mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$ ad	1000 ml

Die Lösung wurde autoklaviert und danach bei $20-22^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Lösung III

KAc	3 M	98,12 g mol^{-1}	294,5 g
		mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$ ad	1000 ml

Den pH-Wert mit Eisessig auf 5,5 einstellen, autoklavieren und bei 4°C lagern.

Diese Methode diente der schnellen Überprüfung von transformierten Bakterienkolonien auf Anwesenheit des gewünschten Klonierungskonstruktes. Dazu wurde 5ml LB-Medium (siehe 2.9.11.1) mit einer Einzelkolonie des ausplattierten Transformationsansatzes angeimpft und üN bei entsprechender Temperatur (siehe 2.8.3) unter Schütteln inkubiert. 1,5ml der Bakteriensuspension wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei 20817g (centrifuge 5417R Eppendorf, Hamburg) für 30-60s pelletiert und das Pellet in 100µl eiskalter Lösung I resuspendiert. Zur alkalischen Lyse wurden 200µl Lösung II zugegeben, vorsichtig gemischt, und nach 5min Inkubation bei 20-22°C wurde die Lösung mit 150µl kalter Lösung III versetzt. Nach vorsichtigem Mischen wurden die Proben für 10min auf Eis inkubiert und anschließend bei 20817g zentrifugiert. Die DNA wurde aus dem Überstand mit 400µl Isopropanol bei 20-22°C präzipitiert. Danach wurde der Ansatz für 20min bei 20817g zentrifugiert, der Überstand vorsichtig dekantiert, die DNA 2mal mit 250µl eiskaltem 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen, bei 56°C für 5-10min getrocknet und schließlich in 20-50µl 10mM Tris/HCl pH 8,5 oder H₂O gelöst.

2.10.1.2 Schnellpräparation von BAC-DNA (BAC-Minipräparation)

Lösungen I-III (siehe 2.10.1.1)

Da die mCMV-BAC-DNA eine Größe von ca. 238kbp besitzt, wurden bei der Isolierung von BAC-DNA jegliche Scherkräfte vermieden. Hierzu wurden beim Pipettieren von BAC-DNA die Pipettenspitzen abgeschnitten und wurde auf vortexen verzichtet. In 15ml Falcon-Reaktionsgefäße wurden 10ml LB-Medium (siehe 2.9.11.1) mit einer Einzelkolonie angeimpft und üN bei 37°C unter Schütteln (230upm) inkubiert. Von der üN-Kultur wurde 1ml Bakteriensuspension zur Anlage einer Glycerolkultur entnommen und der Rest durch Zentrifugation mit 3500upm (Heraeus Labofuge 400R, Rotor 8172) bei 4°C für 5min pelletiert. Das Pellet wurde dann in 200µl Lösung I resuspendiert und in ein 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zur alkalischen Lyse wurden 300µl Lösung II zugegeben, der Ansatz vorsichtig durch Invertieren gemischt, und anschließend für 5min bei 20-22°C inkubiert. Durch Zugabe von 300µl Lösung III und anschließender Inkubation auf Eis für 5-10min wurden SDS, chromosomale DNA und Proteinbestandteile ausgefällt. Nach Zentrifugation mit 20817g (centrifuge 5417R Eppendorf, Hamburg) bei 4°C für 10min wurde der Überstand mit 600µl raumtemperiertem Isopropanol versetzt, suspendiert und erneut für 15min zentrifugiert. Das entstandene DNA-Präzipitat wurde mit 1ml eiskaltem 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen, luftgetrocknet, in 100µl 10mM Tris/HCl pH 8,5 aufgenommen und zum besseren Lösen der DNA für 10min bei 37°C inkubiert. Die Lagerung der BAC-DNA erfolgte bei 4°C!

2.10.1.3 QIAprep Spin Miniprep

Das QIAprep Miniprep Prinzip beruht auf der alkalischen Lyse von Bakterienzellen und anschließender reversibler Adsorption der DNA an eine Silica-Gel-Membran bei unterschiedlichen

Salzkonzentrationen. Aufgrund der wechselnden Reaktionsbedingungen, die während der einzelnen Arbeitsschritte vorherrschen, erfolgt eine Trennung der Plasmid-DNA von übrigen gelösten bzw. ungelösten Bestandteilen (wie z.B. genomische DNA, Proteine und Bakterien-Bruchstücke) und ermöglicht am Ende eine Elution von Plasmid-DNA. Diese Methode wurde v. a. dann herangezogen, wenn besonders reine Plasmid-DNA, wie z. B. für anschließende Sequenzierungen oder Transformationen, benötigt wurde. Die QIAprep Spin Minipreps wurden nach Angaben des Herstellers (QIAprep Miniprep *Handbook*, März 2002; Nr. 27106) mit 1,5ml Bakteriensuspension von einer 5ml üN Kultur durchgeführt. Die DNA konnte mit 50µl Elutions-Puffer (10mM Tris/HCl, pH 8,5) von den Spin-Säulen eluiert werden.

2.10.2 Plasmid-Maxipräparationen

2.10.2.1 QIAGEN Plasmid-Maxipräparation

Plasmid-DNA-Isolierungen im größeren Maßstab wurden mit dem QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Nr. 12162) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Diese Methode beruht auf einer modifizierten alkalischen Lyse der Bakterienzellen und Bindung der DNA unter geeigneten Niedrigsalz- und pH-Bedingungen an ein Anionenaustauscher-Harz. Andere Zellkomponenten, wie z.B. RNA, Proteine und niedermolekulare Substanzen, werden bei mittleren Salzkonzentrationen entfernt. Die gereinigte Plasmid-DNA kann dann bei hohen Salzkonzentrationen vom Anionenaustauscher-Harz eluiert werden. Zur Entsalzung der DNA wird am Ende eine Isopropanol Präzipitation durchgeführt. In der Regel wurde -ausgehend von einer 5-10ml LB-Vorkultur- die eigentliche Übernachtskultur angeimpft. Dazu wurde die Vorkultur 1:1000 in 150ml für Plasmide mit hoher Kopienzahl (*high-copy*) bzw. 500ml für Plasmide mit niedriger Kopienzahl (*low-copy*) in selektivem LB-Medium (siehe 2.9.11.1) verdünnt und unter Schütteln bei entsprechender Temperatur (siehe 2.8.3) für 12-16h inkubiert. (Versuchsprotokoll:

<http://www1.qiagen.com/literature/protocols/QIAGENPlasmidPurification.aspx>)

2.10.2.2 Isolierung von BAC-DNA mit *Nucleobond* PC 500 (BAC-Maxipräparation)

Für die Isolierung größerer Mengen reiner BAC-DNA wurde der *Nucleobond* Kit PC 500 (Nr. 740574.25, Macherey&Nagel) verwendet. Dazu wurden 500ml LB-Medium (siehe 2.9.11.1) 1:500 mit einer frischen Bakterien-Vorkultur angeimpft und üN bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation mit 6300upm (Sorvall RC5C Plus, Rotor: SLA-1500) bei 4°C für 10min pelletiert. Alle daran anschließenden Schritte wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt (<http://www.macherey-nagel.com/web/MN-WEB-webkatalog.nsf/Web/Frames?Open&showpage=DKUL-4KPBYV>). Die Klärung des bakteriellen Lysates erfolgte nicht durch Zentrifugation sondern durch Filtration über einen angefeuchteten

Faltenfilter. Nach der DNA-Fällung durch Isopropanol wurde das Präzipitat in 100-200µl 10mM Tris/HCl, pH 8,5 aufgenommen und bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

2.10.3 Isolierung viraler und zellulärer Nukleinsäuren

2.10.3.1 DNA-Isolierung aus Organen und Geweben

Zur Gewinnung von DNA aus murinem Gewebe wurde der *DNeasy Tissue Kit* (Nr. 69506, QIAGEN) verwendet. Dieser Kit ermöglicht eine schnelle Isolierung von Gesamt-DNA aus frischem oder gefrorenem Organ-Material. Dabei wird das Gewebe lysiert, die DNA selektiv reversibel an eine Silica-Gel Membran gebunden, durch Waschen von Kontaminationen gereinigt und anschließend mit Puffer eluiert.

Um eine optimale Lyse des Materials zu gewährleisten, wurden die Organe zuerst mit Hilfe der Labor-Schwingmühle MM300 von QIAGEN/Retsch homogenisiert. Dazu wurde je nach Organ eine bestimmte Gewebemenge abgewogen, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit Stahlkugel überführt und dann mit der MM300 zerkleinert (siehe Angaben in Tabelle 2.3 sowie Beschreibung des Herstellers bzgl. Bedienung).

Organ	Menge [mg]	Frequenz [Hz]	Zeit [min]	Anzahl und Kugel Ø	Elutionsvolumen [µl]
Pfote	25	30	15	2×4mm	200
Milz	10	30	5	1×3mm	200

Tab. 2.3. Parameter zur DNA Aufreinigung mit MM300 und DNeasy-Tissue-Kit

Die weiteren Schritte der DNA-Reinigung erfolgten nach den Angaben des Herstellers (<http://www1.qiagen.com/literature/protocols/DNeasyTissue.aspx>).

2.10.3.2 Isolierung von viraler DNA

Um virale DNA aus Zellkulturüberstand oder direkt aus Virion-Partikeln zu gewinnen, wurde der *High Pure Viral Nucleic Acid Kit* (Nr. 11858874001, Roche) verwendet. Mit dieser Methode kann die virale DNA aus Zellkulturüberstand bzw. Virionen in kurzer Zeit aufgereinigt werden. Nach der Virus-Lyse in Gegenwart von ProteinaseK erfolgte die reversible Bindung der DNA, in Gegenwart von schützender Poly(A)⁺ Carrier-RNA, an eine Glasfiber-Membran. Nach Reinigung der Nukleinsäuren von Salzen, Proteinen und anderen Kontaminanten durch Waschschrte konnte die gereinigte DNA von der Membran eluiert werden. Die so isolierte DNA diente sowohl zur Überprüfung der Exzision von BAC-Sequenzen nach *in vitro*-Passagierung, als auch zur Bestimmung des Genom-zu-PFU Verhältnisses der mittels BAC-Technologie hergestellten

rekombinanten Viren. Die Isolierung der viralen DNA erfolgte nach Angaben des Herstellers (http://www.roche-applied-science.com/PROD_INF/MANUALS/napi_man/napi.htm).

2.10.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Methode der PCR (Saiki et al., 1988) wurde 1987 von Kary B. Mullis entwickelt. Dazu werden sequenzspezifische Primer benötigt, die die beiden Enden der zu amplifizierenden Bereiche definieren. Mittels PCR können selektiv bestimmte Sequenzbereiche einer DNA millionenfach amplifiziert werden. Ein PCR-Zyklus beginnt mit der thermischen Denaturierung des zu amplifizierenden DNA-Doppelstranges bei etwa 94-95°C. Nach Abkühlung auf eine von der Primer-Sequenz abhängigen *Annealing*-Temperatur erfolgt die Hybridisierung der Oligonukleotide an die einzelsträngigen DNA-Moleküle. Anschließend beginnt eine DNA-Extension durch thermostabile Polymerasen (z.B. HotStar Taq-DNA-Polymerase, Nr. 201205, QIAGEN) bei 72°C. Durch mehrfache Wiederholung dieser Schritte erfolgt eine exponentielle Amplifikation des gewünschten DNA-Fragments. Da sich die Zahl der DNA-Moleküle bei jedem Syntheseschritt verdoppelt, entstehen theoretisch bei n ($n \in \mathbb{N}$) Amplifikationen 2^n Moleküle.

Die Auswahl der sequenzspezifischen Primer erfolgte mit Hilfe des Programms *Primer Express* Version 1.0 (Applied Biosystems). Um eine ausreichende Spezifität zu gewährleisten, war die zur Matrizen-DNA homologe Sequenz wenn möglich mindestens 20 Nukleotide lang. Weiterhin wurde darauf geachtet, dass das 3'-Ende jedes Primers möglichst aus einem Guanosin oder Cytosin besteht, um eine bestmögliche Hybridisierung zu erreichen.

Standard HotStar PCR-Ansatz (PCR-Produkte ≤ 2 kbp), für Biometra Trioblock:

Komponente	Volumen/Reaktion	Endkonzentration
10x PCR Puffer, 15mM MgCl ₂	5µl	1x
dNTP-Mix (10mM jedes)	2,0µl	400µM je dNTP
Primer-for (10pmol/µl)	1,5µl	0,3µM
Primer-rev (10pmol/µl)	1,5µl	0,3µM
HotStar Taq-DNA-Polymerase	0,25µl	1,25U
H ₂ O	variabel	
Matrizen-DNA		
DNA	variabel max. 5µl	100-1000ng genomische DNA 1-50ng Plasmid-DNA

Endvolumen

50µl

—

(Abschließend den Ansatz mit ca. 30µl Mineralöl überschichten)

Standard HotStar PCR-Profil (PCR-Produkte ≤ 2 kbp), für Biometra Trioblock:

Initialer Aktivierungsschritt	15min	95°C	Aktivierung der HotStar Taq-DNA-Polymerase
3-Schritt <i>Cycling</i>			
Denaturierung	30s	94°C	

Annealing	60s	x°C	In Abhängigkeit von der Primer-Sequenz
Extension	60s/1kbp	72°C	
Zyklenzahl	30-35		
Abschließende Extension	10min	72°C	
Ende	∞	4°C	

2.10.4.1 PCR für Klonierungszwecke

Mit Hilfe der PCR ist es möglich, durch die Wahl geeigneter Primer, Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen in eine bestimmte Sequenz einzufügen. Das PCR-Produkt kann nachfolgend in einen Vektor ligiert (siehe 2.9.10) werden. Bei der Primerauswahl wurde darauf geachtet, dass zusätzlich zur spezifischen Erkennungssequenz für die jeweils verwendete Restriktionsendonuklease ein Überhang von mindestens drei *nonsense* Basen vorhanden war, damit auch am Ende eines DNA-Stranges effektiv geschnitten werden konnte (Zimmermann et al., 1998). Um eine möglichst geringe Fehlerrate während der PCR zu erhalten, wurde die *ProofStart* DNA-Polymerase der Firma QIAGEN verwendet. Hierbei handelt es sich um eine rekombinante DNA-Polymerase, die auf einer aus *Pyrococcus spec.* isolierten Polymerase basiert. Sie besitzt eine 3'→5'-, aber keine 5'→3'-Exonuklease-Aktivität. Somit ist sie in der Lage, vom 3'-Ende der wachsenden DNA-Kette falsch eingebaute Nukleotide zu korrigieren. Für größere PCR-Produkte (>2kbp) wurde eine Kombination aus *ProofStart* DNA-Polymerase und Hotstar Taq-DNA-Polymerase (Nr. 202205 und Nr. 201205, QIAGEN) verwendet. Die PCR wurde nach den Angaben des Herstellers (*ProofStart* PCR-Handbook, Februar 2002 oder http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/PDF/PCRAAndReverseTranscription/KitsAndEnzymes/PCR_ProofStart/1021306_HBProofStart_0203WW.pdf) durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden nach der Kontrolle im Gel entweder in einem Elutionsgel aufgetrennt und anschließend mit *QIAquick Spin Gel Extraction-Kit* (siehe 2.9.6) oder direkt mit dem *High Pure PCR Purification Kit* der Firma Roche, Mannheim (siehe 2.9.7) gereinigt und je nach Anwendung weiter bearbeitet.

Standard *ProofStart* PCR-Ansatz (PCR-Produkte ≤ 2kbp), für Biometra Trioblock:

Komponente	Volumen/Reaktion	Endkonzentration
10× <i>ProofStart</i> PCR Puffer	5µl	1×
dNTP-Mix (10mM jedes)	1,5µl	300µM je dNTP
Primer-for (10pmol/µl)	5µl	1µM
Primer-rev (10pmol/µl)	5µl	1µM
<i>ProofStart</i> DNA-Polymerase	1µl	2,5U
H ₂ O	variabel	
Matrizen-DNA		
DNA	variabel max. 5µl	100-1000ng genomische DNA 1-50ng Plasmid-DNA
Endvolumen	50µl	—

(Abschließend den Ansatz mit ca. 30µl Mineralöl überschichten)

Standard *ProofStart* PCR-Profil (PCR-Produkte \leq 2kbp), für Biometra Trioblock:

Initialer Aktivierungsschritt	5min	95°C	Aktivierung der <i>ProofStart</i> DNA-Polymerase
3-Schritt <i>Cycling</i>			
Denaturierung	45s	94°C	
<i>Annealing</i>	60s	x°C	In Abhängigkeit von der Primer-Sequenz
Extension	60s/1kbp	72°C	
Zyklenzahl	30-40		
Ende	∞	4°C	

2.10.4.2 Mutagenese durch Kombinations-PCR

Für die Herstellung von Punktmutationen wird die von Ho et al., 1989 beschriebene Methode verwendet. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass zunächst parallel zwei separate PCRs durchgeführt werden (PCR1 und PCR2, siehe Abb. 2.1), wobei Mut1 und Mut2 zwei Primer mit komplementären Sequenzen sind, die bis auf die zu verändernden Nukleotide ebenfalls homolog zur Matrize sind. Nach Aufreinigung der beiden Amplifikate mittels Gelelektion (siehe 2.9.6) wurde jeweils 1/10 der gereinigten Amplifikate in eine Kombinations-PCR mit den Primern Flank1 und Flank2 eingesetzt, aus der dann das DNA-Fragment mit der gewünschten Mutation resultierte. Das Endprodukt der Kombinations-PCR wurde ebenfalls mittels Gelelektion aufgereinigt. Anschließend konnten die vom jeweiligen Konstrukt abhängigen Klonierungsschritte durchgeführt werden. Die verwendeten Oligonukleotide hatten eine Mindestlänge von 24bp. PCR1, PCR2 und die Kombinations-PCR wurden nach dem in 2.10.4.1 beschriebenen Protokoll durchgeführt.

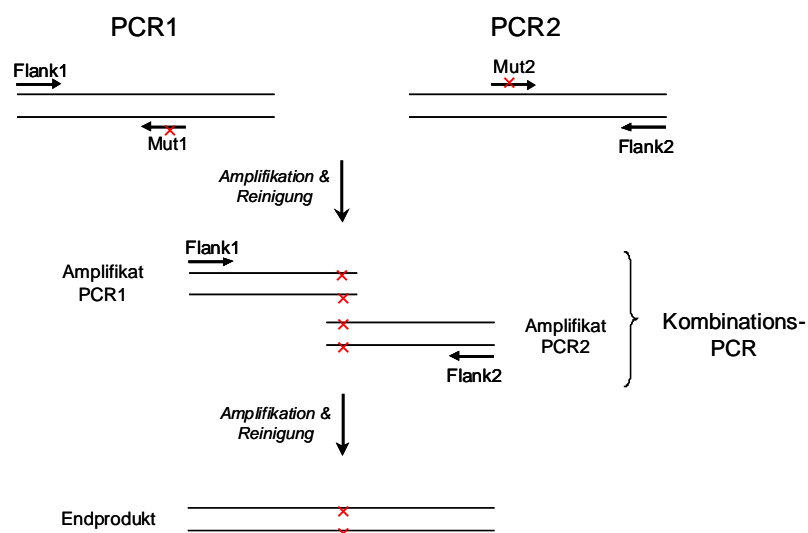


Abb. 2.1: Schematische Darstellung einer Kombinations-PCR zur gerichteten Mutagenese von DNA-Sequenzen. Flank1, Mut1, Mut2 und Flank2 stellen die Primer dar. Mut1 und Mut2 sind komplementär zueinander und unterscheiden sich im Bezug auf die Matrizen-Sequenz nur durch die einzuführende Mutation. In die Kombinations-PCR werden die Primer Flank1 und Flank2 eingesetzt sowie die gereinigten Amplifikate aus PCR1 und PCR2, wobei ein langes DNA-Fragment (Endprodukt) entsteht, das von den eingesetzten Primern begrenzt wird. Details zu dieser Methode sind in 2.10.4.2 beschrieben.

2.10.4.3 Nichtradioaktive PCR-Sequenzierung

Gelzusammensetzung (für 41cm Gelformat):

Sequence XR	24	ml
Sequence complete	6	ml
Ammoniumpersulfat 10% (w/v)	300	µl

Die Komponenten wurden in dieser Reihenfolge zusammenpipettiert und vor dem Gießen des Gels durch einen 0,8µm Filter filtriert.

10×TBE-Puffer (siehe 2.9.5)

Stopp-Puffer:

Bromphenolblau		5	mg
Xylencyanol		5	mg
Na ₂ EDTA×2H ₂ O	20 mM	372,24	g mol ⁻¹ 74,5 mg
		mit entionisiertem Formamid ad	10,0 ml

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach dem Prinzip von Sanger et al., 1977, welches auch als Kettenabbruch- oder Didesoxynukleotid-Verfahren bezeichnet wird. Hierzu wurde der *Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing (7-deaza-dGPT)* Kit (Nr. 25-2438-01, Amersham Biosciences) verwendet. Die Sequenz wurde auf einem automatischen Sequenzer (Modell DNA4000 *one-dye*, der Firma Licor) mit der *Software Base ImageIR* Version 4.1 ausgewertet. Für die Analyse der generierten Sequenzdaten wurde das Programm *Clone Manager Suite* Version 7.04 (*Scientific & Educational Software*, USA) verwendet. Die Sequenzier-Reaktion wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei jeder Sequenzier-Ansatz ein Gesamtvolumen von 4,5µl hatte:

Plasmid-DNA (max 100ng)	2,5	µl
Sequenzier-Oligonukleotid 0,025pmol/µl (5'-IRD800)	1	µl
Nukleotid-Reaktions-Mix (vorgefertigt)	1	µl
Σ	4,5	µl

Die Ansätze wurden mit ca. 20µl Mineralöl überschichtet und die Sequenzier-Reaktion in einem Biometra Trioblock-*Thermocycler* mit dem Programm 30×[95°C 30", T_A 45", 72°C 30"]; 72°C 5'; 95°C 5' durchgeführt. Die Hybridisierungstemperatur T_A kann mit der Formel:

$$T_A (^{\circ}\text{C}) = 69,4 + 0,41 \times \%(\text{GC}) - 650 / n + 3$$

ermittelt werden. Mit %GC: *Prozentsatz der Nukleotide Guanosin und Cytosin* und *n: Primerlänge in Nukleotiden*. Nach Zugabe von je 2µl Stopp-Puffer pro Sequenzier-Ansatz wurde jeweils 1µl jedes Ansatzes auf ein 41cm Sequenz-Gel (6% (v/v) Acrylamid) aufgetragen. Der Gel-Lauf wurde

bei 1500V, 35 mA und 50°C durchgeführt. Die Sequenz wurde vom Computer automatisch detektiert und ausgewertet, musste jedoch abschließend auf ihre Korrektheit überprüft werden.

2.10.4.4 Quantitative Real-Time-PCR (qPCR)

Bei einer konventionellen PCR erfolgt die Detektion der PCR-Amplifikate in der finalen Phase oder am Endpunkt der PCR durch Agarose-Gelelektrophorese und anschließender Färbung der DNA mit Ethidiumbromid. Im Gegensatz dazu wird bei einer qPCR die Detektion der PCR-Amplifikate (Amplikons) in der frühen (exponentiellen) Phase der PCR realisiert, die sich durch eine exakte Verdopplung (Reaktionseffizienz 100%) der Amplikons auszeichnet. Die Detektion kann entweder nicht-sequenzspezifisch mit dsDNA bindenden Fluorochromen (z.B. *SYBR Green*l.) oder sequenzspezifisch mit fluorogenen Sonden (z.B. *TaqMan* Sonden, *FRET* Sonden oder *Molecular Beacons*) erfolgen. Aufgrund der Proportionalität von Fluoreszenzsignal und Kopienzahl des Zielmoleküls kann direkt eine Mengenbestimmung der zu untersuchenden Probe durchgeführt werden.

Die Auswahl der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten sequenzspezifischen Oligonukleotide (siehe 2.8.1.2) erfolgte mit Hilfe des Programms *Primer-Express* Version 1.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

2.10.4.4.1 *TaqMan* PCR

Die PCR-Reaktionen wurden an einem *TaqMan* (ABI 7700) mit der Softwareversion *Sequence Detection* (SDS) 1.9.1 durchgeführt. Da die Detektion mit *SYBR Green* erfolgte, musste am Ende eines jeden PCR-Laufs eine Schmelzkurven-Analyse (*Dissociation Curves* (DC) Version 1.0) durchgeführt werden. Diese ermöglicht eine Diskriminierung spezifischer Amplifikate von unspezifischen PCR-Produkten, wie z.B. Oligonukleotid-Dimeren. Wichtig: SDS nie zusammen mit DC starten!

TaqMan- bzw. *Light Cyclers*-Ansatz (QuantiTect SYBR Green PCR Kit, Nr. 204143 QIAGEN)

Komponente	Volumen/Reaktion	Endkonzentration
2xQuantiTect SYBR Green Master Mix	10µl	1×
LCPTHrP_For2 o. LCgB_For3 (10pmol/µl)	2µl	1µM
LCPTHrP_Rev2 o. LCgB_Rev3 (10pmol/µl)	2µl	1µM
RNase freies H ₂ O (im Kit enthalten)	4µl	—
Matrizen-DNA	2µl	max. 100ng/Ansatz
Endvolumen	20µl	—

TaqMan PCR-Profil:

Initialer Aktivierungsschritt	15min	95°C	Aktivierung der HotStar Taq-DNA-Polymerase
3-Schritt Cycling			
Denaturierung	15s	94°C	
Annealing	30s	62°C	
Extension	30s	72°C	Daten Akquisition
Zyklenzahl	50		
Schmelzkurve			
Denaturierung	15s	95°C	
Annealing	30s	60°C	
Set Ramp Time	19:59	60-95°C	kontinuierliche Daten Akquisition
Denaturierung	15s	95°C	
Ende	∞	25°C	

Bemerkung:

Aufgrund der großen Probenzahl wurden die Messungen in der vorliegenden Arbeit mit einem *TaqMan* (96 Plätze) durchgeführt, da dieser im Gegensatz zum *Light Cycler* (32 Plätze; Roche, Mannheim) in einem Lauf die dreifache Probenmenge analysieren kann. Mit dem verwendeten *QuantiTect SYBR Green* Kit der Firma QIAGEN konnten mit beiden *Real-Time* Geräten reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden. Das entsprechende *Light Cycler* PCR-Profil befindet sich im Anhang 6.6.

2.10.5 Southernblotanalyse

Für den Southern-Blot werden DNA-Fragmente zunächst nach ihrem Molekulargewicht in Agarose-Gelen elektrophoretisch getrennt. Die DNA wird anschließend mit Hilfe der einseitig gerichteten Kapillarblot-Methode (Southern, 1975) auf einen Filter transferiert und fixiert. Danach können zu analysierende DNA-Sequenzen durch Hybridisierung mit einer spezifischen Sonde und abschließender Detektion nachgewiesen werden.

2.10.5.1 Transfer von DNA auf feste TrägerNaOH-Lösung

NaOH	5	M	40,01 g mol ⁻¹	200	g
			mit H ₂ O _{demin.} ad	1000	ml

NaCl-Lösung

NaCl	5	M	58,44 g mol ⁻¹	292,2	g
			mit H ₂ O _{demin.} ad	1000	ml

Blotpuffer (0,5M NaOH; 1M NaCl)

NaOH	5	M		100	ml
NaCl	5	M		200	ml
			mit H ₂ O _{demin.} ad	1000	ml

20×SSC

NaCl	3	M	58,44	g mol ⁻¹	175,3	g	
Na ₃ -Citrat×2H ₂ O	0,3	M	294,1	g mol ⁻¹	88,2	g	
					mit H ₂ O _{demin.} ad	1000	ml

Den pH-Wert der Lösung mit konz. HCl auf pH 7,0 einstellen.

Denaturierungslösung

NaOH	1	M	40,01	g mol ⁻¹	40,01	g	
NaCl	1,5	M	58,44	g mol ⁻¹	87,7	g	
					mit H ₂ O _{demin.} ad	1000	ml

Neutralisationslösung

Tris	1	M	121,1	g mol ⁻¹	121,1	g	
NaCl	3	M	58,44	g mol ⁻¹	175,3	g	
					mit H ₂ O _{demin.} ad	1000	ml

Zum qualitativen Nachweis von DNA-Sequenzen aus einer PCR wurden je 20µl des PCR-Ansatzes auf ein 1- bis 2%iges (w/v) Agarose-Gel (abhängig von der Größe des PCR-Fragmentes) aufgetragen. Die DNA wurde nach der Gelelektrophorese unter gleichzeitiger Denaturierung auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert. Dazu wurde das Gel auf eine doppelte Lage eines in Blotpuffer getränkten zweilagigen Whatman-Filterpapiers gelegt, dessen Enden in eine Wanne mit Blotpuffer ragten. Auf das Gel wurde eine positiv geladene Nylonmembran (*GeneScreen Plus*; Perkin-Elmer) gelegt, die zuvor für 5min in 6×SSC und dann 30s in Blotpuffer getränkt wurde. Als nächstes kamen auf die Membran zwei Lagen (in Blotpuffer getränktes) Whatmanpapier und mehrere Lagen Saugpapier zu liegen. Bei allen beschriebenen Schritten ist darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen bilden. Vereinzelt auftretende Luftblasen können durch Rollen mit einer Pipette entfernt werden. Zum Schluss wurde auf die Saugpapiere eine Glasplatte gelegt und diese mit einem ca. 500g schweren Gewicht beschwert. Am nächsten Tag wurde die Membran kurz in 6×SSC gewaschen. Die transferierte DNA wurde durch *Crosslinking* (254nm, 0,120Jcm⁻²) auf der Membran fixiert. Bis zur weiteren Behandlung war es möglich, die Nylonmembran zwischen zwei Whatmanpapieren im Dunkeln bei 20-22°C für einige Zeit aufzubewahren.

Zum DNA-Transfer von mCMV-BAC-DNA nach Restriktion und Gelelektrophorese auf Nylonmembranen wurde das Agarose-Gel zunächst 2mal für je 10min in Depurinierungslösung

(0,25M HCl) depuriniert. Dabei entstehen kleinere DNA-Fragmente, die während einem Kapillartransfer leichter diffundieren können. Das Gel wurde kurz in $H_2O_{demin.}$ gewaschen und danach zum Denaturieren der DNA 2mal für je 15min in Denaturierungslösung geschwenkt. Anschließend wurde das Gel erneut kurz in $H_2O_{demin.}$ gewaschen, bevor es 2mal für je 30min mit Neutralisierungslösung neutralisiert wurde. Alle Inkubationsschritte erfolgten bei 20-22°C auf einem Schüttler. Beim anschließenden Transfer (üN) auf eine positiv geladene Nylonmembran (s. o.) wurde 20×SSC verwendet (Aufbau der Blot-Einheit s. o.). Am nächsten Tag konnte die Membran wie oben beschrieben weiter behandelt.

2.10.5.2 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden

Die Markierung von Oligonukleotiden erfolgte mit der T4 Polynukleotidkinase (PNK, Nr. 10709557001, Roche) in Gegenwart von ^{32}P - γ -ATP am 5'-Ende durch Anhängen einer radioaktiven Phosphatgruppe. Dazu wurden die folgenden Komponenten in der entsprechenden Reihenfolge in ein 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß auf Eis gegeben:

10×PNK Reaktionspuffer	2	μ l
Oligonukleotid (10pmol/ μ l)	3	μ l
$H_2O_{demin.}$	11	μ l
PNK (10 U/ μ l)	1	μ l
^{32}P - γ -ATP	3	μ l (Zugabe erst im Isotopen-Labor!)
Endvolumen	20	μ l

Nach Zugabe aller Komponenten wurde der Reaktionsansatz vorsichtig gemischt, kurz abzentrifugiert, für 20min bei 37°C inkubiert und durch Zugabe von 1 μ l 0,5M EDTA oder rasches Abkühlen auf Eis gestoppt. Zur Abtrennung nicht eingebauter Radioaktivität erfolgte eine Gelfiltration mit einer Sepharose-Gelfiltrationssäule (NAP 5 Säule, Sephadex G25). Diese musste zunächst 3mal mit $H_2O_{demin.}$ äquilibriert werden. Anschließend wurde erst das Reaktionsgemisch, dann 480 μ l $H_2O_{demin.}$ auf die Säule pipettiert. Der erste Durchlauf, welcher noch keine Radioaktivität enthielt, konnte verworfen werden. Die radioaktiv markierten Oligonukleotide wurden durch Zugabe von 1000 μ l $H_2O_{demin.}$ von der Säule eluiert. Die nicht in Oligonukleotide eingebaute Radioaktivität blieb auf der Säule zurück. Die markierten Oligonukleotide wurden mit Hybridisierungslösung versetzt, direkt in eine Hybridisierung eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung bei 4°C im Kühlschrank gelagert (für max. 2 Wochen).

2.10.5.3 Hybridisierung von Nylonmembranen mit radioaktiv markierten DNA-Proben

50×Denhardts-Lösung

BSA	1% (w/v)			10	g
PVP-10	1% (w/v)	10000	g mol ⁻¹	10	g
Ficoll-400	1% (w/v)			10	g
				mit H ₂ O _{demin.} ad	1000 ml

Lösung wurde filtriert und bei -20°C gelagert

20×SSPE-Lösung

NaCl	3,6	M	58,44	g mol ⁻¹	210,4	g
NaH ₂ PO ₄ ×2H ₂ O	0,2	M	156,01	g mol ⁻¹	31,2	g
EDTA×2H ₂ O	20	mM	372,24	g mol ⁻¹	7,4	g
				mit H ₂ O _{demin.} ad	1000	ml

Der pH-Wert wurde mit konz. NaOH auf 7,4 eingestellt und die Lösung anschließend autoklaviert.

Prähybridisierungs-/ Hybridisierungslösung

20×SSPE					500	ml
50×Denhardts-Lösung					300	ml
10×SDS					20	ml
Heringssperma-DNA					0,04	g
				mit H ₂ O _{demin.} ad	2000	ml

Zuerst Wasser vorlegen, da Komponenten sonst ausfallen. Lösung aliquotiert bei -20°C lagern.

Phosphatpuffer (A)

Na ₂ HPO ₄ ×2H ₂ O	1	M	177,96	g mol ⁻¹	177,96	g
				mit H ₂ O _{demin.} ad	1000	ml

Phosphatpuffer (B)

NaH ₂ PO ₄ ×2H ₂ O	1	M	156,01	g mol ⁻¹	156,01	g
				mit H ₂ O _{demin.} ad	1000	ml

Phosphatpuffer-Stock: 920ml (A) + 250ml (B), mit 5M NaOH auf pH 7,2 einstellen und danach autoklavieren.

Waschlösung I

Phosphatpuffer-Stock					200	ml
10 % (w/v) SDS					100	ml
				mit H ₂ O _{demin.} ad	1000	ml

Waschlösung II

Phosphatpuffer-Stock		100	ml
10 % (w/v) SDS		100	ml
	mit H ₂ O _{demin.} ad	1000	ml

Waschlösung III

Phosphatpuffer-Stock		50	ml
10 % (w/v) SDS		100	ml
	mit H ₂ O _{demin.} ad	1000	ml

Stripping-Lösung

TRIS	10 mM	121,1	gmol ⁻¹	1,21	g
EDTA×2H ₂ O	1 mM	372,24	gmol ⁻¹	0,372	g
10 % (w/v) SDS				100	ml
				mit H ₂ O _{demin.} ad	1000 ml

Die Prähybridisierung, Hybridisierung und das Waschen der Membran erfolgte in Glasflaschen (Biometra), die sich auf einer rotierenden Trommel in einem Hybridisierungssofen (Biometra) befanden. Die Hybridisierungstemperatur ist abhängig vom Schmelzpunkt der Oligonukleotide. Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten markierten Oligonukleotide konnten bei 58°C hybridisiert werden.

Die Prähybridisierung der DNA-tragenden Nylonmembran war nötig, um freie Membranbindungsflächen zu blockieren und diese somit für Sondenmoleküle unzugänglich zu machen. Dazu wurde die trockene Membran für eine Minute in H₂O_{demin.} äquilibriert. Danach konnte diese in 10-15ml Prähybridisierungslösung überführt und bei 58°C für 2-5h prähybridisiert werden. Anschließend wurde die Prähybridisierungslösung verworfen, die radioaktiv markierte Sonde zupipettiert und üN hybridisiert. Die Hybridisierungslösung wurde abgenommen und bis zur weiteren Verwendung für max. zwei Wochen bei 4°C gelagert. Um unspezifisch gebundene Sondenmoleküle zu entfernen, wurde die Membran 1× für 2min bei 58°C mit Waschpuffer I gewaschen. Unter stringenten Bedingungen wurde die Nylonmembran 1× für 2min bei 58°C mit Waschpuffer II gewaschen. Mit dem Handmonitor konnte zwischen den einzelnen Waschschrinen die Abnahme der Radioaktivität verfolgt werden. Je nach Radioaktivität der Membran konnte noch 1× für 1-3 min bei 58°C mit Waschpuffer III gewaschen werden. Nach dem Waschen wurde die Membran -luftblasenfrei- in eine Frischhaltefolie eingepackt, danach in einer Autoradiographiekassette mit Verstärkerfolie und Röntgenfilm (Kodak, X-OMAT AR) bei -70°C exponiert oder mit Hilfe einer Bildplatte und einem *Phosphorimager* (siehe 2.10.5.4) ausgewertet.

2.10.5.4 Detektion radioaktiv markierter Nukleinsäuren

Eine an Nylonmembran gebundene Radioaktivität, die von einer mit ^{32}P -markierten Oligonukleotid-Probe ausgeht, kann mit Hilfe eines Röntgenfilms oder einer Bildplatte mit anschließender Bearbeitung an einem *Phosphoimager* permanent sichtbar gemacht werden.

Nach der Exposition wurden die Röntgenfilme in Kodak LX24 entwickelt (1-2min), eine Minute gewässert und in Kodak AL4 (1-2min) fixiert.

2.11 Herstellung rekombinanter mCMV mittels BAC- (*Bacterial Artificial Chromosome*) Technologie

Die Generierung von mCMV-Rekombinanten mit Punktmutationen in den C-terminalen MHC-Klasse-I-Ankeraminoacidsäuren der immundominanten Peptide IE1 und m164 erfolgte mittels Zwei-Schritt-Rekombinationsverfahren in *E. coli*.

Die Insertion einer HA-Epitop-Sequenz aus dem Hämagglutininprotein (HA) des Influenza-A-Virus in das 3'- bzw. 5'-Ende des ORFs *m164* wurde mit dem Ein-Schritt-Rekombinationsverfahren durchgeführt.

Alle dazu benötigten Plasmide wurden unserer Arbeitsgruppe freundlicherweise von U. H. Koszinowski, Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Mikrobiologie in München, zur Verfügung gestellt.

2.11.1 Mutagenese mittels Zwei-Schritt-Rekombinationsverfahren im *E. coli* Stamm DH10B

Antibiotika-Stammlösungen:

Chloramphenicol (Cam)	34mg/ml	(in Ethanol (100%); 1:2000, $c_{\text{End}}=17\mu\text{g/ml}$)
Kanamycin (Kan)	10mg/ml	(in $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst.}}$, 1:400, $c_{\text{End}}=25\mu\text{g/ml}$)

Die Lösungen wurden sterilfiltriert und danach bei -20°C gelagert. Die Zugabe der Antibiotika erfolgte immer nach dem Autoklavieren des Mediums.

LB-Medium: (siehe 2.9.11.1)

LB-Agarplatten: (siehe 2.9.11.2)

Elektrokompetente Bakterien: (siehe 2.9.12.3)

Die Zwei-Schritt-Rekombinationsmutagenese in *E. coli* 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.

Alle mCMV-sequenzspezifischen Manipulationen (Mutationen, Umklonierungen, etc.) wurden in *high-copy* Vektoren durchgeführt. In einem abschließenden Klonierungsschritt wurde dann das manipulierte DNA-Fragment in das *low-copy Shuttle*-Plasmid pST76K_SR (Pósfai et al., 1997; Hobom et al., 2000; Borst et al., 2004) ligiert. Um eine effektive und spezifische homologe Rekombination zwischen *Shuttle*-Plasmid und mCMV-BAC-Plasmid zu ermöglichen, musste die Mutation von gleich langen Sequenzen, homolog zum Integrationsort (1,5-3kbp zu jeder Seite, Smith, G. R., 1988), flankiert werden.

I. Cotransformation des Shuttle-Plasmids und Bildung der Cointegrate

50µl elektrokompetente DH10B Bakterien, die das zu mutierende mCMV-BAC-Plasmid enthielten, wurden mit 1ng *Shuttle*-Plasmid-DNA elektro-transformiert (siehe 2.9.12.4) und für 1h in LB-Medium (ohne Antibiotika) bei 30°C geschüttelt. Danach wurde der gesamte Ansatz auf LB-Cam-Kan-Platten ausgestrichen und für 1-2 Tage im Brutschrank bei 30°C inkubiert. Bei diesem ersten Schritt erfolgt die homologe Rekombination und somit die Bildung von Cointegraten (vollständige Insertion der *Shuttle*-Plasmid-DNA in das mCMV-BAC-Plasmid).

II. Anreicherung der Cointegrate und Entfernung der Shuttle-Plasmide

Zur Identifizierung von Cointegrat-Klonen wurden 10 Bakterienkolonien von Schritt I auf LB-Cam-Kan-Platten ausgestrichen (Verdünnungsausstrich!) und üN im Brutschrank bei exakt 43°C inkubiert. Bei 43°C können nur Cointegrate, nicht aber *Shuttle*-Plasmide replizieren, weil bei dieser Temperatur ein falsch gefaltetes RepA-Protein entsteht das den temperatur-sensitiven Replikationsursprung pSC101 nicht mehr induzieren kann (Hashimoto-Gotoh et al., 1981; Steinmetz et al., 1983, Blomfield et al., 1991). Dabei ist es essentiell, dass sich große Einzel-Kolonien entwickeln. Kleine Kolonien haben keine Bedeutung! Deshalb kann es notwendig sein, die Bakterienkolonien ein zweites oder drittes Mal auszustreichen, um große Einzel-Kolonien zu erhalten.

III. Überprüfung der Cointegrate (optional)

Bis zu 10 große Einzel-Kolonien von Schritt II wurden zum Animpfen von je einer 10ml üN LB-Cam-Kan-Kultur und zur Isolierung der BAC-DNA (Schnellpräparations-DNA, siehe 2.10.1.2) verwendet. Nach Bestätigung korrekt inserierter Cointegrate durch Restriktions-Analyse der Schnellpräparations-DNA mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen (*EcoRI*, *HindIII* und *XbaI*) konnten korrekte Klone für die weitere Mutagenese verwendet werden.

IV. Cointegrat-Auflösung

10 Bakterienkolonien der üN bei 43°C inkubierten LB-Agarplatten aus Schritt II bzw. der bestätigten Cointegrate aus Schritt III wurden auf LB-Cam-Platten als Verdünnungsausstrich ausplattiert und ca. 30h bei 30°C inkubiert. Dieser Schritt konnte optional wiederholt werden, um

Kolonien zu vereinzeln und zur weiteren Ermöglichung der homologen Rekombination. Die resultierenden Klone sind eine Mischung aus Bakterien mit aufgelösten Cointegraten und Bakterien mit nicht-aufgelösten Cointegraten.

V. Selektion gegen nicht-aufgelöste Cointegrate

Zur Identifizierung aufgelöster Cointegrate wurden die Klone aus Schritt IV auf LB-Cam+5% (w/v) Saccharose-Platten ausgestrichen. Dazu wurde jeweils ein Klon von je einer Platte gepickt, ausgestrichen und ca. 30h bei 30°C inkubiert. Dieser Schritt musste mindestens 2mal wiederholt werden. Bakterien mit nicht-aufgelösten Cointegraten können unter diesen Bedingungen nicht replizieren, da sie noch im Besitz des *SacB*-Gens sind. Das *SacB*-Gen steht unter der Kontrolle des Lac-Promotors und dieser wird in Gegenwart von Saccharose aktiviert. Dies führt zur Expression des Exoenzyms Levan-Saccharase, welches die Synthese des Polysaccharids Levan aus Saccharose katalysiert (Steinmetz et al., 1983; Blomfield et al., 1991). Infolgedessen kommt es zur Akkumulation von Levan im periplasmatischen Raum mit letalen Konsequenzen für *E. coli* (Gay et al., 1983).

VI. Testen auf aufgelöste Cointegrate

Aufgelöste Cointegrate konnten aufgrund ihrer Kan-Sensitivität erkannt werden. Daher wurden 100 große Einzelkolonien aus Schritt V parallel auf Platten mit Kan und auf Platten mit Cam üN bei 37°C auf ihre Vermehrung hin getestet. Dabei ist es wichtig zuerst die Kan- und dann erst die Cam-Platte zu beimpfen. Es sollten mindestens 80% der Klone Kan-sensitiv sein. Gelegentlich bleibt die *Kan^{Res}* erhalten; dann kann es helfen, zurück zu Schritt IV zu gehen.

VII. Charakterisierung Kanamycin-sensitiver Klone

Von 10 Kan-sensitiven Bakterienkolonien wurde je eine 10ml LB-Cam üN Kultur angeimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde die BAC-DNA isoliert (siehe 2.10.1.2) und diese mittels Restriktions-Analyse charakterisiert. Weiterhin wurden von diesen Klonen Glycerolkulturen angelegt und bei -70°C gelagert. Da in dieser Arbeit überwiegend mCMV-Mutanten mit Punktmutationen generiert wurden, konnten diese nach einer Restriktions-Analyse nicht direkt identifiziert werden. Jedoch konnte durch Restriktions-Analyse die globale Integrität des mCMV-Genoms bestätigt werden. Dieses kann in seltenen Fällen Deletionen aufweisen, da es als Folge der transienten Expression des *RecA-Proteins* zu Instabilitäten, durch unerwünschte intramolekulare Rekombinationsereignisse im mCMV-BAC-Genom kommen kann (Horsburgh et al., 1999; Smith and Enquist, 1999). Zur Identifizierung der Punktmutationen musste mit der isolierten BAC-DNA zunächst eine PCR (siehe 2.10.4.1) durchgeführt werden. Die Amplifikate wurden in einem Agarose-Gel aufgetrennt, anschließend aus dem Gel eluiert (siehe 2.9.6) und dann sequenziert (siehe 2.10.4.3). Statistisch sollten 50% der Klone dieser Kolonien das korrekt mutierte mCMV-BAC-Plasmid enthalten.

VIII. Virusrekonstitution:

Die abschließende Virusrekonstitution erfolgte in MEF. Dazu wurde von positiv sequenzierten Klonen eine Isolierung von mCMV-BAC-DNA mit *Nucleobond* PC 500 durchgeführt (siehe 2.10.2.2). Um die Qualität der isolierten mCMV-BAC-DNA zu überprüfen, wurde noch einmal eine Restriktions-Analyse durchgeführt. Ergab die abschließende Auftrennung der restringierten mCMV-BAC-DNA im Agarose-Gel ein korrektes Bandenmuster (siehe Abb. 3.9), dann war die DNA-Qualität hoch und die mCMV-BAC-DNA konnte in MEF transfiziert werden (siehe 2.4.4.1).

2.11.2 mCMV-BAC-Mutagenese durch das Ein-Schritt- Rekombinationsverfahren im *E. coli* Stamm DH10B

Antibiotika-Stammlösungen:

Chloramphenicol (Cam)	34mg/ml	(in Ethanol (100%); 1:2000, $c_{\text{End}}=17\mu\text{g/ml}$)
Kanamycin (Kan)	10mg/ml	(in $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst.}}$, 1:400, $c_{\text{End}}=25\mu\text{g/ml}$)
Ampicillin (Amp)	100mg/ml	(in $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst.}}$, 1:2000, $c_{\text{End}}=50\mu\text{g/ml}$)

Die Lösungen wurden sterilfiltriert und danach bei -20°C gelagert. Die Zugabe der Antibiotika erfolgte immer nach dem Autoklavieren des Mediums.

LB-Medium: (siehe 2.9.11.1)

LB-Agarplatten: (siehe 2.9.11.2)

Glycerin-Lösung: 10% (v/v), frisch angesetzt, sterilfiltriert.

L-Arabinose-Lösung: 10% (w/v), frisch angesetzt, sterilfiltriert. (L-Arabinose, Sigma-Aldrich München, Nr. A-3256)

Die Durchführung der Ein-Schritt-Rekombinationsmutagenese von mCMV-BAC-Plasmiden erfolgte in Anlehnung an die Arbeiten von Oliner et al., 1990, Zhang et al., 1997 sowie insbesondere Wagner & Koszinowski 2004.

2.11.2.1 Transformation des Plasmids pKD46, Herstellung elektrokompetenter und Arabinose-induzierter Bakterien

Zur Durchführung der Ein-Schritt-Rekombinationsmutagenese muss zuerst die Transformation des Plasmids pKD46 (pKD46 exprimiert die für die Rekombination benötigten Red-Rekombinations-Proteine, Datsenko & Wanner, 2000) in kompetente DH10B-Bakterien, die bereits das zu mutierende mCMV-BAC-Plasmid enthalten, erfolgen. Anschließend wird durch Zugabe von L-Arabinose die Expression der Rekombinations-Proteine *exo*, *bet* -und *gam* induziert. Erst nach diesen beiden Schritten können die Bakterien für die Elektrotransformation vorbereitet werden.

50 μl elektrokompetente DH10B Bakterien, die das zu mutierende mCMV-BAC-Plasmid enthielten, wurden mit 5ng pKD46 elektro-transformiert (siehe 2.9.12.4) und anschließend für 1h in LB-

Medium (ohne Antibiotika) bei 30°C geschüttelt. Danach wurde 1/10 Ansatz auf LB-Cam-Amp-Platten ausgestrichen und üN im Brutschrank bei 30°C inkubiert. Das *low-copy* Plasmid pKD46 besitzt den Temperatur-sensitiven Replikationsursprung pSC101 und repliziert bei 30°C (Temperaturen >37°C führen zum Verlust des Plasmids, siehe 2.11.1).

Am nächsten Tag wurde eine Einzelkolonie zum Animpfen einer 5ml LB-Cam-Amp-Vorkultur gepickt und üN unter Schütteln (240upm) bei 30°C inkubiert. Mit 2ml dieser Vorkultur wurden 200ml einer frisch hergestellten LB-Cam-Amp 0,1% (v/v) L-Arabinose-Lösung (2ml frisch hergestellte 10% (w/v) L-Arabinose + 198ml LB-Cam-Amp-Medium) angeimpft und solange bei 30°C geschüttelt (240upm) bis die OD₆₀₀ zwischen 0,3 und 0,5 lag (ca. 2 bis 2,5h). War sie höher, wurde der Ansatz verworfen. Nach Erreichen der gewünschten OD₆₀₀ wurde die Bakterienkultur unverzüglich für 15min auf Eis gekühlt und anschließend für 10min mit 7000upm (4°C, mit vorgekühltem Rotor SLA-3000, Sorvall RC 5C Plus) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet auf Eis in 10ml 10% (v/v) Glycerin-Lösung mit einer 5ml Glaspipette resuspendiert, danach mit 200ml 10% (v/v) Glycerin-Lösung versetzt und erneut zentrifugiert (siehe oben). Dieser Schritt wurde 2mal wiederholt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand dekantiert und mit einem Papiertuch die am oberen Zentrifugenbecherrand vorhandene Glycerin-Lösung entfernt. Das Bakterienpellet wurde in einem Gesamtvolumen von 900µl 10%iger (v/v) Glycerin-Lösung resuspendiert (in den meisten Fällen waren die geringen Reste an 10%iger (v/v) Glycerin-Lösung im Zentrifugenbecher dafür ausreichend). Danach konnten ca. 6 Aliquots à 60µl auf 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäße (in Trockeneis vorgekühlt) verteilt, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert werden.

Bemerkungen:

- Alle Präparationsschritte müssen auf Eis erfolgen und alle Materialien (z.B. 5ml Glaspipette zum Resuspendieren der Bakterien; Rotoren für die Zentrifuge!!!) auf 4°C vorgekühlt sein! Zu warme Bedingungen können zum kompletten Verlust der Kompetenz führen!
- Die Expression der Rekombinasen auf dem Plasmid pKD46 kann in Gegenwart von Glucose reprimiert werden, deshalb ist es essentiell dem LB-Medium keine Glucose zuzusetzen.
- Die Expression der Rekombinasen kann zu Instabilitäten im mCMV-BAC-Genom führen, da es zu nicht erwünschten intramolekularen Rekombinationsereignissen zwischen sich wiederholenden Gensequenzen, innerhalb des mCMV-BAC-Plasmids kommen kann. Eine geringere Menge an exprimierten Rekombinasen in den Bakterien erniedrigt zwar das Risiko der BAC-Instabilität, führt gleichzeitig aber auch zu einer geringeren Insertions-Effizienz des DNA-Rekombinations-Fragments. Deshalb kann es nötig sein, die Integrität des mCMV-BAC-Plasmids nach der Präparation der elektrokompenten Bakterien zu testen. Im Falle einer Instabilität sollte die Induktionszeit mit 0,1% (w/v) L-Arabinose reduziert werden.

- Es scheint, dass die Rekombinationseffizienz bei Bakterien die bei einer $OD_{600} < 0,4$ gewachsen sind etwas höher lag.
- Nach Abschluss der Kompetenzinduktion muss diese überprüft werden. Dabei sollte bei einer Transformation eines Standard *high-copy* Plasmids mindestens 10^8 cfu/ μ g DNA erreicht werden. Die Kompetenz von chemisch kompetenten Bakterien ist nicht ausreichend.

2.11.2.2 Herstellung und Aufreinigung des PCR-Fragments mit viralen Homologien an den Enden

Die PCR wurde im Prinzip wie unter 2.10.4.1 beschrieben mit der QIAGEN *ProofStart* DNA-Polymerase durchgeführt. Zur Amplifikation des Kanamycin-Resistenzgens aus dem Plasmid pGP704Kan (freundlicherweise von M. Messerle, Universität Hannover, zur Verfügung gestellt) wurden Oligonukleotide verwendet, die bis zu 70bp lange bei der ersten PCR-Runde nicht mit der Template-DNA hybridisierende 5'-Enden besitzen. Dazu mussten folgende Bedingungen gewählt werden:

ProofStart PCR-Ansatz für PE-Cycler:

Komponente	Volumen/Reaktion	Endkonzentration
10× <i>ProofStart</i> PCR Puffer	5 μ l	1×
dNTP-Mix (10mM jedes)	1,5 μ l	300 μ M je dNTP
<i>Primer-for</i> (10pmol/ μ l)	2,5 μ l	0,5 μ M
<i>Primer-rev</i> (10pmol/ μ l)	2,5 μ l	0,5 μ M
<i>ProofStart</i> DNA-Polymerase	1 μ l	2,5U
H ₂ O	variabel	
Matrizen-DNA		
DNA	variabel (max. 5 μ l)	3-10ng Matrizen-DNA
Endvolumen	50 μ l	—

ProofStart PCR-Profil, für PE-Cycler:

			Bemerkungen
Initialer Aktivierungsschritt	5min	95°C	Aktivierung der <i>ProofStart</i> DNA-Polymerase
<i>Touch-down</i> PCR:			
Denaturierung	30s	94°C	
Annealing	2min	62°C	Start <u>immer</u> bei 62°C
Extension	2min/~1kbp	68°C	
Zyklenzahl	18	62-45°C	pro Zyklus Temperatur um 1°C erniedrigen
Abschließend: 12×[30s, 94°C; 2min, 45°C; 2min/~1kbp, 68°C]; ∞ 4°C			

Um eine erfolgreiche PCR mit dem gewünschten PCR-Fragment zu bestätigen, wurden 5 μ l des PCR-Ansatzes mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.9.5) untersucht. Waren die Bedingungen optimal (d.h. Detektion nur eines spezifischen PCR-Produkts) wurden insgesamt

noch 5 weitere PCR-Ansätze durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Gel-Aufreinigung der PCR-Ansätze mit Hilfe des *QIAquick Spin Gel Extraction-Kits* (siehe 2.9.6). Die Elution der DNA von den dafür verwendeten 6 Säulen erfolgte mit je 50µl Elutions-Puffer. Nach Vereinigung der Eluate wurde direkt eine Ethanol-Fällung (siehe 2.9.2) durchgeführt und die DNA in 25µl H₂O_{reinst.} gelöst. Kurzzeitig konnte die DNA bei -20°C gelagert werden.

Bemerkungen:

- Die Entfernung aller Reste an Matrizen-DNA mit Hilfe des Restriktionsenzym *DpnI* ist nicht nötig, da das Plasmid pGP704Kan λpir-abhängig repliziert und somit in dem *E. coli* Stamm DH10B nicht replizieren kann.
- *Binding-Site* 5'-PCR-Oligonukleotid auf dem Plasmid pGP704Kan: 5'AGG ACG ACG ACG ACA AGT AA 3'
Binding-Site 3'-PCR-Oligonukleotid auf dem Plasmid pGP704Kan: 5' CAG GAA CAC TTA ACG GCT GA 3'
- Die bei der PCR verwendeten und bis zu 90 Nukleotide langen Oligonukleotide wurden grundsätzlich durch HPLC gereinigt und ausschließlich von der Firma Metabion GmbH in München bezogen.
- Damit später der Selektionsmarker Kanamycin mit Hilfe der FLP-Rekombinase aus dem mCMV-BAC-Plasmid entfernt werden kann, muss dieser zuvor von FRT-Erkennungssequenzen flankiert worden sein. Dies wird während der PCR mit dem Plasmid pGP704Kan realisiert.
- Für eine erfolgreiche Homologe Rekombination zwischen dem PCR-Fragment und der mCMV-BAC-DNA wird ein Homologiebereich von 40bp benötigt.
- Der Bereich zwischen Oligonukleotid-Bindungsstelle und viralem Homologie-Arm kann für das Einfügen von zusätzlicher DNA-Sequenz genutzt werden, wie z.B. in der vorliegenden Arbeit für die Insertion einer HA-Epitop-Sequenz (aus dem Hämagglutininprotein des Influenza-A-Virus) an das 3'- bzw. 5'-Ende des ORFs *m164* aus mCMV.

2.11.2.3 Transformation des PCR-Fragments in Arabinose-induzierte Bakterien

5µl (0,5-1,5µg DNA) des in 25µl H₂O vorliegenden PCR-Fragments wurden durch Elektroporation (2,5kV; 200Ω; 25mF, *Gene-Pulser*, BIO-RAD, siehe 2.9.12.4) in 60µl der präparierten DH10B (siehe 2.11.2.1) transformiert. Nach sofortiger Zugabe von 1ml LB-Medium wurden die Bakterien ohne Antibiotika-Zusatz für 1,5h bei 37°C geschüttelt und dann wurde der gesamte Transformationsansatz auf LB-Cam-Kan-Platten ausgestrichen. Während einer Inkubation üN (mind. 12-16h) bei 37°C konnten Bakterienkolonien mit erfolgreich mutierten mCMV-BAC-Plasmiden entstehen. Zur weiteren Analyse wurden 10-20 Klone gepickt, 10ml üN Kulturen

angeimpft, BAC-DNA isoliert (siehe 2.10.1.2) und diese nach Restriktion z.B. mit *Eco* RI im Agarose-Gel analysiert.

Bemerkungen:

- Immer frische Elektroporations-Küvetten (\varnothing 0,2cm, BIO-RAD) verwenden und diese 30min auf Eis vorkühlen.
- Da nach der Transformation des PCR-Fragments nicht mehr mit Ampicillin/Chloramphenicol selektioniert wird, sondern mit Kanamycin/Chloramphenicol, kommt es in der Regel zum Verlust des Plasmids pKD46 (Besitzt Amp^{Res}).

2.11.2.4 Exzision des mit FRT-Sequenzen flankierten Selektionsmarkers

Zur Entfernung des Selektionsmarkers Kanamycin aus dem mutierten mCMV-BAC-Plasmid nach der Mutagenese wurden DH10B-Bakterien, die das mutierte mCMV-BAC-Plasmid enthielten, chemisch kompetent (siehe 2.9.12.1) gemacht und anschließend mit dem Plasmid pCP20 (2-10ng) transformiert (siehe 2.9.12.2) und bei 30°C für 1h inkubiert. 1/10 Vol. des Transformationsansatzes wurde auf LB-Cam-Amp-Platten ausgestrichen und üN bei 30°C im Brutschrank inkubiert. Hierbei wird durch die vom pCP20-Plasmid exprimierte FLP-Rekombinase das Herausschneiden des Selektionsmarkers (Kanamycin) ermöglicht. Am nächsten Tag wurden 5 Einzelkolonien gepickt, auf LB-Cam-Platten ausgestrichen und bei 43°C üN inkubiert (Verlust des pCP20-Plasmids, vgl. 2.11.1 II). Dann wurden 50-100 Kolonien auf Sensitivität gegen die vom herausgeschnittenen Selektionsmarker vermittelte Antibiotikaresistenz getestet. Dazu wurden die Einzelkolonien parallel auf Platten mit Kanamycin und auf Platten mit Chloramphenicol üN bei 37°C auf Vermehrung getestet. Dabei ist es wichtig, zuerst die Kanamycin- und dann erst die Chloramphenicol-Platte zu beimpfen. Im Idealfall ist nur auf der Chloramphenicol-Platte ein Wachstum zu beobachten. Klone, die auf beiden Platten wachsen konnten, fanden keine weitere Verwendung, da diese immer noch den Selektionsmarker enthielten. Von 10 Kanamycin-sensitiven Bakterienkolonien wurde je eine 10ml LB-Cam üN Kultur angeimpft und diese bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde die BAC-DNA isoliert (siehe 2.10.1.2), anschließend mittels Restriktions-Analyse charakterisiert und entsprechend wie in Kapitel 2.11.1 VII-VIII beschrieben weiter verarbeitet.

2.12 Immunologische Methoden

2.12.1 ELISpot (Enzyme linked immuno spot)-Assay

In Analogie zum *ELISA* (Enzyme linked immunosorbent) -Assay werden auch beim *ELISpot*-Assay Zytokine mit Hilfe von Antikörper-Paaren nachgewiesen, die an verschiedene Epitope des gleichen Zytokins binden. Im Gegensatz zum *ELISA*, bei welchem die Menge an sezerniertem Zytokin im

Überstand gemessen wird, können beim *ELISpot-Assay* Zytokin-sezernierende Zellen auf Einzelzellebene nachgewiesen werden. Da die Spotgröße mit der Menge an sezerniertem Zytokin korreliert, ermöglicht der *ELISpot-Assay* sowohl eine quantitative Erfassung der Zahl reaktiver Zellen, als auch die Beurteilung der Intensität der induzierten Aktivierung.

Die während der Inkubationsphase sezernierten Zytokine binden unmittelbar an die mit Primärantikörper beschichtete, unterhalb der Zellen befindliche Nylonmembran der Mikrotiterplatten. Die gebundenen Zytokine können mit Hilfe eines biotinylierten Sekundärantikörpers, Streptavidin-Peroxidase und eines Chromogens visualisiert werden. Einzelne Zytokin-sezernierende Zellen führen somit zur Bildung so genannter Spots. Die Anzahl der Spots entspricht dabei der Anzahl Zytokin-sezernierender Zellen. (Taguchi et al., 1990; Miyahira et al., 1995).

Puffer für Primärantikörper (Coating-Puffer):

Stammlösung **A**: Na_2CO_3 150mM $105,99\text{g mol}^{-1}$ 1,59g ad 100ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$

Stammlösung **B**: $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times \text{H}_2\text{O}$ 150mM $84,01\text{g mol}^{-1}$ 2,93g ad 100ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$

Jeweils 1ml **A** + 1ml **B** ad 10ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$ mit Stammlösung **B** auf pH 9,6 einstellen.

Puffer für Sekundärantikörper (Dilutions-Puffer):

PBS + 1% (v/v) einer 23,3%igen BSA-Lösung (Ortho Diagnostic Systems, Neckargemünd; Nr. 959311). Ansatz für eine *ELISpot*-Platte: 5,5ml PBS + 60 μl BSA-Lösung

Bemerkung: Die beiden Antikörper-Puffer am Versuchstag frisch ansetzen.

Wasch-Puffer:

Tween20	0,25% (v/v)		1,25	ml
		mit PBS ad	500	ml

Na-Acetat-Puffer pH 5,0:

$\text{NaAc} \times 3\text{H}_2\text{O}$	34 mM	$136,08 \text{ g mol}^{-1}$	4,59	g
Essigsäure	16 mM	$60,05 \text{ g mol}^{-1}$	979	μl
		mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$ ad	1000	ml

HRPO (Horseradish peroxidase)-Streptavidin Konjugat:

1mg in 1ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$ lösen, wenn frisch mindestens 1h vor Gebrauch ansetzen, Lagerung bei 4°C.

Konjugat-Verdünnungs-Puffer:

FCS	5% (v/v)		250	μl
		mit Wasch-Puffer ad	5	ml

Medium: MEM-ALPHA + 10% (v/v) FCS

Weiterhin werden benötigt:

- Antigenpräsentierende Zellen (APZ): P815-B7
- mCMV-Peptide (siehe 2.3.4) zum Beladen der APZ
- Hybridom Ziellinie zur polyklonalen Stimulation von T-Zellen: 145-2C11
- Effektor-Zellen
- 3-Amino-9-ethyl-Carbazol (AEC), (Sigma-Aldrich, München; Nr. A-6926)
- 96-Well-Nylonmembran-Platten (Nunc, Wiesbaden, Nr. 256154)

Zur Beschichtung der Membran einer 96-Well-Nylonmembran-Platte wurden 55µl/Well einer Verdünnung des Primärantikörpers pipettiert, die zuvor mit frisch angesetztem *Coating*-Puffer auf eine Endkonzentration von 5µg/ml eingestellt worden war. Der Ansatz wurde üN bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte 4mal jeweils im Abstand von 15min mit H₂O_{reinst.} gewaschen. Anschließend erfolgte die Blockierung freier Membranbindungsstellen mit 200µl Medium pro Well für mindestens 1h bei 37°C.

Die APZ (P815-B7) wurden geerntet, gewaschen (5min, 1400upm, Heraeus Megafuge 2.0), gezählt und auf eine Zellzahl von $1 \times 10^5/50\mu\text{l}$ pro Well eingestellt. Zum Nachweis Peptid-spezifischer T-Zellen wurden die APZ zusätzlich mit dem korrespondierenden Peptid (Endkonzentration: 10^{-8}M) für 2h bei 37°C inkubiert.

Die Effektor-Zellen wurden nach ihrer Aufarbeitung (siehe 2.12.2) ebenfalls gewaschen, gezählt und anschließend so titriert, dass Bestimmung der Spotanzahl in mindestens zwei Verdünnungsstufen zur statistischen Auswertung der Ergebnisse herangezogen werden konnte.

Nach der Blockierung wurde das alte Medium entfernt und 50µl/Well frisches Medium vorgelegt. Danach wurden jeweils 50µl der APZ und 50µl der Effektoren in Triplikaten zupipettiert und üN (12-18h) bei 37°C im Brutschrank co-kultiviert.

Danach wurden die Zellen durch 10maliges Waschen mit 200µl/Well Waschpuffer entfernt. Der Sekundärantikörper wurde in Dilutions-Puffer auf 1µg/ml verdünnt, in 50µl/Well auspipettiert und für 2h bei 20-22°C inkubiert. Im Anschluss daran wurden ungebundene Sekundärantikörper-Moleküle durch 5maliges Waschen mit 200µl/Well Waschpuffer entfernt. Anschließend wurden 60µl des *HRPO*-Streptavidin-Konjugates, das zuvor 1:250 in Waschpuffer + 5% (v/v) FCS verdünnt worden war, in jedes Well gegeben und für weitere 2h bei 20-22°C belassen. Nach der Inkubation wurde die Platte erneut 5mal mit Waschpuffer gewaschen.

Die Visualisierung der sezernierten Zytokine erfolgte durch Zugabe des Meerrettichperoxidase-Substrats AEC. Dazu wurden 20mg (1 Tablette) AEC in 2,5ml Dimethylformamid gelöst, mit 47,5ml Na-Acetat-Puffer gemischt, mit 25µl 30%igem H₂O₂ versetzt und filtriert (0,8µm). In jedes Well wurden 70µl pipettiert. Die Färbereaktion wurde nach ca. 10min durch 3maliges Waschen mit

H₂O_{reinst.} gestoppt. Schließlich wurde die Membran von der Platte abgezogen und an der Luft getrocknet. Die Auswertung erfolgte bei 10-facher Vergrößerung mit Hilfe eines Stereomikroskops.

2.12.2 Gewinnung von Lymphozyten aus Organen

2.12.2.1 Milz

Die Isolierung von CD8 T-Lymphozyten aus Milzzellen latent-infizierter Mäuse erfolgte frühestens 3 Monate nach mCMV-Infektion. Die Milzzellen wurden vor der Verwendung als Effektoren im *ELISpot*-Assay grundsätzlich einer CD8 T-Zellsortierung mit Hilfe des CD8-MACS-Separation-Systems (siehe 2.12.3) unterzogen.

Red Blood Cell Lysing Buffer (RBLB): (Sigma-Aldrich, Nr. R 7757)

Medium: RPMI + 5% (v/v) FCS

Die Milzen wurden steril entnommen und in ein mit Medium gefülltes 4ml Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Organe auf einem Metallsieb zerrieben, das auf dem Bodenteil einer Petrischale auflag. Das Sieb wurde mit Medium gespült und die aufgefangene Zellsuspension pelletiert (5min, 1900upm, Megafuge 2.0 Heraeus). Zur Erythrozytenlyse wurde der Überstand verworfen, das Pellet in RBLB (2ml/Milz) resuspendiert und 1-2min bei 20-22°C geschwenkt. Danach wurden die Zellen 2-3-mal mit Medium gewaschen, bis der Überstand klar war. Das Zellpellet wurde dann in einem definierten Vol. MACS-Puffer (siehe 2.12.3) aufgenommen, über ein Nylonsieb (100µm, Falcon) filtriert und die Zellzahl (siehe 2.4.2) bestimmt. Die erwartete Zellzahl in der Milz eines 5 Monaten alten, unbehandelten Tieres liegt bei etwa 1×10^8 Zellen/Milz.

2.12.2.2 Lymphknoten

Die isolierten T-Lymphozyten aus Lymphknoten wurden vor der Verwendung im *ELISpot*-Assay grundsätzlich einer CD8 T-Zellsortierung mit Hilfe des CD8-MACS-Separation-Systems (siehe 2.12.3) unterzogen.

Medium: RPMI + 5% (v/v) FCS

Die ipsilateralen poplitealen Lymphknoten von intraplantar mCMV-infizierten Mäusen wurden 8 Tage p.i. steril entnommen und in ein mit Medium gefülltes Röhrchen gegeben. Anschließend wurden die Lymphknoten auf einem Metallsieb zerrieben (Vgl. 2.12.2.1). Das Sieb wurde mit Medium gespült und die aufgefangene Zellsuspension pelletiert (5min, 1900upm, Megafuge 2.0 Heraeus). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet 2mal mit Medium gewaschen. Danach wurde das Pellet in einem definiertem Vol. MACS-Puffer (siehe 2.12.3) aufgenommen,

über ein Nygonsieb (100µm, Falcon) filtriert und die Zellzahl (siehe 2.4.2) bestimmt. Die erwartete Zellzahl eines unbehandelten Tieres liegt bei etwa 1×10^6 Zellen/Lymphknoten.

2.12.3 Magnetische Anreicherung CD8-positiver T-Lymphozyten (MACS)

Das Prinzip der magnetischen Zellanreicherung basiert auf der Bindung monoklonaler Antikörper an deren Fc-Teil paramagnetische Partikel aus Fe-(II)-Oxid kovalent gebunden sind. Binden diese als *MicroBeads* bezeichneten Partikel spezifisch an das entsprechende Epitop auf der Zelloberfläche, dann werden sie im Magnetfeld in der Matrix der Separationseinheit (LS-Säule, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach; Nr. 130-042-401) zurückgehalten, während ungebundene Zellen durchlaufen. Die Elution der Zellen erfolgt durch Spülen der Säule außerhalb des Magnetfeldes.

MACS-Puffer:

BSA	0,5% (w/v)		2,5	g
EDTA×2H ₂ O	2 mM	372,24 g mol ⁻¹	0,372	g
		mit PBS ad	500	ml

Lösung sterilfiltrieren (0,2µm) und bei 4°C lagern.

Medium: MEM-ALPHA + 10% (v/v) FCS

Weiterhin werden benötigt:

- MACS *Multistand* Miltenyi Biotec; Nr. 130-042-303
- MidiMACS Miltenyi Biotec; Nr. 130-042-302

Nachdem die Zellen aufgearbeitet (siehe 2.12.2.1 bzw. 2.12.2.2) waren, wurden sie erneut in MACS-Puffer gewaschen (5min, 2500upm, Eppendorf 5414C) und anschließend wurde die Zellzahl ermittelt. 1×10^7 Zellen wurden in 90µl MACS-Puffer resuspendiert und es erfolgte die Zugabe von 10µl CD8a *MicroBeads* (siehe 2.1.6). Da die maximale Kapazität einer LS-Säule 10^8 positiv-markierte Zellen beträgt, wurden, um Verstopfungen der Säulen-Matrix zu vermeiden, höchstens 5×10^7 positiv-markierte Zellen pro Säule aufgetragen. Danach wurde der Ansatz für 15min bei 4°C inkubiert, anschließend 2mal mit MACS-Puffer gewaschen (10min, 1700upm, Eppendorf 5414C) und in 500µl MACS-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde dann auf die zuvor 2mal mit ca. 4ml MACS-Puffer äquilibrierte, im Magnetfeld befindliche LS-Säule gegeben. Während dieses Schrittes binden die mit *MicroBeads* markierten CD8-positiven Zellen an die Matrix, wohingegen unmarkierte Zellen die Säule passieren. Danach wurde die Säule mit ca. 4ml MACS-Puffer gespült. Die Elution der positiv angereicherten Zellen erfolgte außerhalb des

Magnetfeldes mit 4ml MACS-Puffer. Danach wurden die CD8-positiven Zellen 2mal mit Medium gewaschen (5min, 2500upm, Eppendorf 5414C). Nach Bestimmung der Zellzahl, wurden die CD8 T-Zellen in einem definierten Vol. Medium aufgenommen. Zur Erhöhung der Reinheit konnten die Zellen ggf. ein zweites Mal über eine LS-Säule gegeben werden.

2.13 Histologie

2.13.1 Vorbereitung der Organe für die histologischen Färbungen

Um die Zahl der infizierten Zellen nach Infektion mit rekombinanten Cytomegaloviren *in situ* im Zeitverlauf vergleichen zu können, wurde die Leber histologisch untersucht.

Formalin (gepuffert)

KH ₂ PO ₄	67 mM	136,09 g mol ⁻¹	9,07 g
Na ₂ HPO ₄ ×H ₂ O	84 mM	177,99 g mol ⁻¹	14,95 g
Formalin	37% (v/v)		140 ml
		mit H ₂ O _{demin.} ad	1000 ml

Den pH-Wert mit NaOH auf 7,4 einstellen.

I. Dehydratisierung und Paraffineinbettung der Gewebestücke

Für die histologische Färbung wurde die Einbettung in Paraffin gewählt, da diese eine sehr gute Strukturhaltung der Gewebe ermöglicht. Die entnommenen Organe wurden in 4% (v/v) gepuffertem Formalin für ca. 18h fixiert und anschließend für 2h in Leitungswasser gewaschen. Da Wasser mit Paraffin nicht mischbar ist, muss es durch eine aufsteigende Alkoholreihe aus den Geweben entfernt werden. Um osmotisch bedingte Zellschädigungen zu vermeiden, muss der Wasserentzug in kleinen Schritten erfolgen. Nach vollständiger Dehydrierung der Organe wurden diese in Xylol inkubiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Dazu wurden die Objekte jeweils für 45min in 20% (v/v), 40%, 60%, 80%, 90% und 3× in 100% (v/v) Isopropanol inkubiert. Danach folgten Inkubationen in reinem Xylol (3× 1h) und in reinem Paraffin bei 55°C (1× 4h, 1× 8-16h, 1× 4h) bevor die Organe in heißem Paraffin (50-70°C) eingeblockt wurden.

II. Anfertigung von Gewebeschnitten:

Zum Schneiden der Blöckchen wurden diese bei -20°C eingefroren und am Mikrotom mit einer Schnittdicke von 2µm geschnitten. Die Serienschnitte wurden zuerst im Kaltwasserbad (20°C) aufgefangen und dann im Warmwasserbad (40°C) gestreckt, um auf einen Objektträger aufgezogen werden zu können. Zur Glättung, Trocknung und Anheftung der Schnitte auf den Objektträgern wurden diese ün im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

III. Deparaffinierung und Rehydratisierung:

Damit die Objekte weiteren Behandlungen unterzogen werden konnten, musste zunächst das Paraffin entfernt und mussten die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe rehydratisiert werden.

Deparaffinierung: • 3 × 5 min mit Xylol

Rehydratisierung:

- 2 × 3 min mit 100 % (v/v) Isopropanol
- je 1 × 3 min mit 90 % (v/v) / 70 % / 50 % Isopropanol
- 1 × 2 min mit H₂O_{demin.}

2.13.2 mCMV-IE1-Immunhistochemie10×TBS-Puffer

Tris	1	M	121,1	g mol ⁻¹	121,1	g
NaCl	1,5	mM	58,44	g mol ⁻¹	87,6	g
				mit H ₂ O _{demin.} ad	1000	ml

Mit HCl pH 7,4 einstellen, Gebrauchslösung 1×TBS-Puffer.

BSA-TBS-Stammlösung

BSA	10%	(w/v)			10	g
				mit 1×TBS ad	100	ml

Lösung bei -20°C lagern, Gebrauchslösung 1% (v/v) in 1×TBS, ebenfalls bei -20°C lagern.

Trypsin-Lösung

KCl	2,7	mM	74,6	g mol ⁻¹	0,2	g
NaCl	137	mM	58,44	g mol ⁻¹	8	g
KH ₂ PO ₄	1,5	mM	136,09	g mol ⁻¹	0,2	g
Na ₂ HPO ₄ ×2H ₂ O	8,1	mM	177,99	g mol ⁻¹	1,44	g
EDTA×2H ₂ O	3,4	mM	372,24	g mol ⁻¹	1,25	g
				mit H ₂ O _{demin.} ad	1000	ml

Den pH-Wert der Lösung mit NaOH auf 7,4 einstellen, autoklavieren und danach 1,25g Trypsin (1:250, Difco, USA) zugeben.

Mit mCMV infizierte Zellen können immunhistochemisch (IHC) mit einem anti-mCMV-IE1 (pp89)-spezifischen Antikörper (Croma 101) nachgewiesen werden. Die rehydratisierten Gewebeschnitte

wurden zur Permeabilisierung 15min bei 37°C in Trypsin-Lösung inkubiert und danach 3× 1min in H₂O_{demin.} gewaschen.

Endogene Peroxidasen wurden mit Methanol-H₂O₂ (30ml Methanol, 30ml PBS und 1ml 30% (v/v) H₂O₂) durch 30min Inkubation bei 20-22°C inaktiviert. Anschließend wurden die Objekte 3× 1min in TBS gewaschen. Zur Blockierung unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen wurden die Schnitte mit 1:10 verdünntem Kaninchenserum in 1% (v/v) BSA-TBS für 20min bei 20-22°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurde das Serum durch leichtes Abklopfen von den Objektträgern entfernt.

Die Markierung der Schnitte mit dem IE1-spezifischen monoklonalen Antikörper Croma 101 [1:500 verdünnt in 1:10 verdünntem Kaninchenserum (in 1% (v/v) BSA-TBS)] erfolgte bei 37°C für 1h. Nichtgebundene Antikörper wurden durch 3× Waschen in 1×TBS entfernt. Im Anschluss daran wurden die Gewebeschnitte in einer feuchten Kammer für 30min bei 20-22°C mit dem biotinylierten polyklonalen Ziege Antikörper gerichtet gegen Maus IgG (Fab) (siehe 2.1.6) (1:200 in 1% (v/v) BSA-TBS verdünnt) inkubiert.

Inzwischen konnte der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex angesetzt werden (Vectastain ABC Kit PK-4000: 10µl Reagenz A + 10µl Reagenz B ad 1ml mit 1% (v/v) BSA-TBS, 30min Inkubation bei 20-22°C). Nach Entfernung der Antikörper durch 3× Waschen für eine Minute in 1×TBS erfolgte eine 30minütige Inkubation (feuchte Kammer) der Objekte mit dem frisch angesetzten Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex. Nichtgebundene Komplexmoleküle wurden durch Waschen in 1× TBS (3×15min) entfernt.

Die Substratreaktion wurde durch Zugabe von Färbelösung (10mg Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) + 75mg NiSO₄×6H₂O in 50ml Tris-Puffer lösen, filtrieren und anschließend 17ml 30% (v/v) H₂O₂ zugeben) gestartet, wobei DAB als Substrat für die Peroxidase diente und Nickelsulfat die Färbung durch Bildung eines schwarzen Präzipitates verstärkte. Die Färbereaktion wurde nach 10min durch Waschen in 1× TBS (3× 1min) abgestoppt.

Anschließend wurden die Objekte 3s mit Hämalan (Hämalan nach Mayer) gegengefärbt, wodurch sich die Zellkerne nicht-infizierter Zellen blau färbten. Abschließend wurden die Gewebeschnitte in einer schnell aufsteigenden Isopropanolreihe für jeweils 30s in 50% (v/v), 70%, 90% und 2× in 100% (v/v) Isopropanol dehydratisiert, an der Luft getrocknet, 3× kurz in Xylol geschwenkt und durch Einbetten in das synthetische Einschlussmittel Entellan dauerhaft konserviert.

Danach wurde die Zahl IE1-positiver Zellen pro Fläche Gewebeschnitt (üblicherweise 10mm²) mittels Durchlichtmikroskopie bestimmt.

3 Ergebnisse

Die Lunge ist ein Hauptort von CMV Pathogenese, Latenz und Reaktivierung. Im BALB/c Modellsystem der murinen CMV-Infektion nach experimenteller KMT terminieren infiltrierende antivirale CD8 T-Zellen die akute, produktive Infektion der Lunge und verhindern so eine disseminierte interstitielle Pneumonie (Podlech et al., 2000). Das virale Genom verbleibt im Lungengewebe in einem nicht-replikativen Zustand (Kurz et al., 1997) der im Sinne der Definition von Roizman & Sears (1987) als molekulare Latenz bezeichnet wird. Das virale Genom ist aber nicht transkriptionell inaktiv (Kurz et al., 1999a, b; Grzimek et al., 2001). Die unter der Kontrolle des *Major Immediate Early Enhancer* (MIE) stehenden Gene *ie1* und *ie2* werden zu jedem Zeitpunkt in der Lunge in einer geringen Frequenz transkribiert (Grzimek et al., 2001), wohingegen das für den essentiellen Transaktivator IE3 (Angulo et al., 2000) kodierende IE3-Transkript nicht entsteht (Kurz et al., 1999) und folglich weder *Early* (E) Proteine noch infektiöses Virus gebildet werden können. Das *ie1* Gen kodiert das IE1-Protein pp76/89, für das im MHC-Haplotyp *H-2^d* das immundominante MHC-Klasse-I *L^d*-restringierte IE1-Peptid 168-YPHFMPTNL-176 bekannt ist (Reddehase et al., 1989). Die Expression des *ie1*-Gens während der Viruslatenz begründet die Hypothese einer Kontrolle der Latenz durch IE1-Peptid-spezifische CD8 T-Zellen. Der erbrachte Nachweis einer relativen und absoluten Anreicherung aktivierter, IE1-Peptid-spezifischer CD8 T-Zellen in persistierenden Lungeninfiltraten nach Etablierung von Viruslatenz steht im Einklang mit dieser Hypothese, ist aber noch kein formaler Beweis für ihre Richtigkeit (Holtappels et al., 1998, 2000c; Podlech et al. 2000).

Um diesen Beweis erbringen zu können wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals ein rekombinantes mCMV generiert, in dem durch Mutation der C-terminalen MHC-Klasse-I-(*L^d*)-Ankeramino-säure die Prozessierung und Präsentation des IE1-Peptids gezielt verhindert ist. Dabei lag ein Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Etablierung der Technik der BAC-Mutagenese herpesviraler Genome (Messerle et al., 1997, Borst et al., 1999, 2004; Wagner et al., 1999) in unserer Arbeitsgruppe. Damit waren die technischen Voraussetzungen gegeben, um ein ganzes Set rekombinanter mCMV mit Mutationen in der Position der C-terminalen MHC-Klasse-I-Ankeramino-säure des IE1-Peptids herzustellen. Der Herstellung rekombinanter mCMV folgte die *in vitro* und *in vivo* Charakterisierung der Rekombinanten. Zur Untersuchung der *in vivo*-Replikation wurde in dieser Arbeit eine quantitative *Real-Time-PCR* (qPCR) entwickelt mit der es u. a. möglich war, die Zahl der viralen Genome pro Zelle zu bestimmen.

Neben dem IE1-Peptid wurde von der Arbeitsgruppe ein *D^d*-restringiertes Peptid 257-AGPPRYSRI-265 aus dem E-Phase Protein pORFm164 entdeckt, das eine zum IE1-Peptid vergleichbar hohe Frequenz an antiviralen CD8 T-Zellen induziert (Holtappels et al., 2002a). Es konnte zudem gezeigt werden, dass nahezu 80% aller *Memory* CD8 T-Zellen im Haplotyp *H-2^d* gegen diese beiden Peptide gerichtet sind. Da das m164-Peptid über „Reverse Immunologie“ aus der genomischen Sequenz identifiziert wurde, war über das m164-Protein zu Beginn der Arbeit

noch nichts bekannt. Genexpressionsstudien während der Latenz wurden für *m164* bisher noch nicht durchgeführt, so dass im Moment nicht bekannt ist, ob für *m164* ein zum *ie1* vergleichbares Latenz-assoziiertes Expressionsmuster existiert. Zur Klärung der Rolle des zweiten immundominanten mCMV-Peptids wurden in dieser Arbeit weitere rekombinante mCMV generiert in denen durch Punktmutation der C-terminalen MHC-Klasse-I-Ankerposition die Prozessierung und Präsentation des m164-Peptids gezielt verhindert wird.

3.1 Generierung von mCMV-Rekombinanten mit Punktmutationen im MHC-Anker Codon

Die Mechanismen der Etablierung und Aufrechterhaltung der Herpesvirus-Latenz sowie der Reaktivierung zu produktiver Infektion sind trotz intensiver Forschung weitgehend ungeklärt. Unserer Arbeitsgruppe gelang der Nachweis einer stochastischen Expression des *ie1* Gens während der mCMV-Latenz in der Lunge (Kurz et al., 1999; Grzimek et al., 2001) sowie der Anreicherung IE1-Peptid-spezifischer CD8 T-Zellen in persistierenden Lungeninfiltraten (Holtappels et al., 2000c). Wenn nun die in der Lunge angereicherten IE1-Peptid-spezifischen CD8 T-Zellen die Latenz-assoziierte Expression des *ie1* Gens bestimmen und die Progression der viralen Genexpression verhindern, dann sollte das Expressionsmuster bei fehlender Präsentation des IE1-Peptids verändert sein. Zur Prüfung dieser Hypothese sollte mittels BAC-Mutagenese eine Virusrekombinante hergestellt werden, in der die Präsentation des IE1-Peptids 168-YPHFMPTNL-176 selektiv durch Punktmutation in der C-terminalen MHC-Klasse-I- (L^d) -Ankeramino-säure Leu verhindert wird (siehe Abb. 3.1). Für das IE1-Peptid wurde der Einfluss von C-terminalen Aminosäure-Austauschen auf L^d -Bindung und CTL Erkennung mit synthetischen Peptiden in den Arbeiten von Reddehase & Koszinowski 1991 sowie Rognan et al., 1992 ermittelt. Die Ergebnisse sind in nachstehender Tabelle 3.1 gezeigt.

YPHFMPTN-	X	Grenzmolarität der Erkennung [\log_{10} M]
	—	> -3
	Leu	-9
	Ala	-3
	Ile	-5
	Phe	-9
	Met	-8
	Val	-3
	Asn	> -3
	Tyr	-5
	Trp	> -3

Tab. 3.1 Einfluss C-terminaler Mutationen auf die Antigenität IE1-analoger synthetischer Peptide.

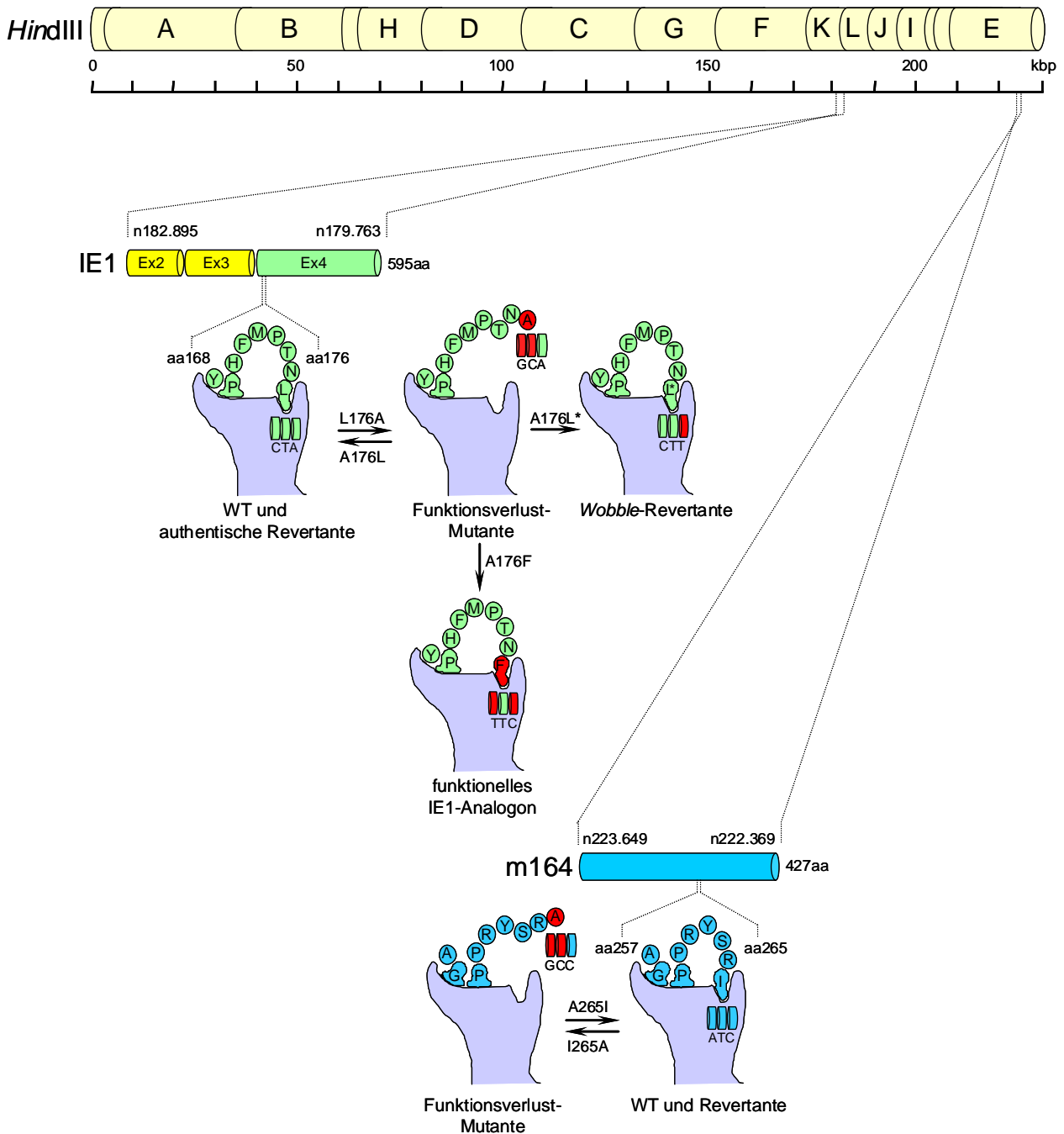


Abb. 3.1. Zerstörung der IE1- und m164-Antigenität durch Mutation der entsprechenden C-terminalen MHC-Klasse-I-Ankeramino­säure. Physikalische *HindIII*-Genkarte des WT-mCMV-Genoms. Nukleotidpositionen (n) beziehen sich auf die WT-mCMV-Sequenz nach Rawlinson et al. 1996. Gezeigt sind die Lokalisation der Proteine IE1 (Ex2, 3 gelb, sowie Ex4 grün) und m164 (blau) sowie Position und Sequenz der entsprechenden CD8 T-Zellepitope. Das Bindungsprinzip der CD8 T-Zellepitope an das jeweils präsentierende MHC-Klasse-I-Molekül ist durch Cartoons (nach Rammensee) veranschaulicht. Durch gezielte Punktmutationen (rot) der C-terminalen MHC-Klasse-I-Ankeramino­säure des IE1-Peptids (L[CTA]176A[GCA] bzw. des m164-Peptids (I[GCC]265A[ATC]) wird die Präsentation dieser beiden mutierten Peptide, aufgrund ineffizienter Bindung von Alanin in die Bindungstasche des MHC-Klasse-I-Moleküls verhindert. Die Pfeile zwischen den MHC-Klasse-I-Molekülen geben den Verlauf der Mutanten- bzw. Revertanten-Herstellung an. Neben der authentischen Revertante A[GCA]176L[CTA] sollten für das IE1-Peptid eine durch die *Wobble*-Position genetisch markierte Revertante A[GCA]176L*[CTT] sowie ein funktionelles IE1-Analogon A[GCA]176F[TTC] generiert werden. Für das m164-Peptid sollte zunächst die authentische Revertante A[GCC]265I[ATC] hergestellt werden. Weiterhin waren die Generierung einer Doppelmutante, in der die Präsentation beider Peptide verhindert wird, sowie die Herstellung der korrespondierenden Doppelrevertante geplant.

Der konservativste Austausch, der zu mindestens 6 Log₁₀-Stufen Antigenitätsverlust führt, ist die Mutation L176A, die effizienteste nicht homologe Restitution ist die Rück-Mutation A176F.

Basierend auf diesen theoretischen Grundlagen sollten folgende IE1 Mutanten generiert werden:

1. mCMV-IE1-L176A (Funktionsverlust-Mutante)
2. mCMV-IE1-A176L (authentische Revertante)
3. mCMV-IE1-A176L* (genetisch markierte Revertante, im Folgenden als *Wobble*-Revertante bezeichnet)
4. mCMV-IE1-A176F (funktionelles IE1-Analogon)

Zur Klärung der Rolle des zweiten immundominanten mCMV-Peptids, eines Peptids aus dem ORF $m164$, war die Herstellung weiterer mCMV-Mutanten geplant. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Prozessierung und Antigenität des m164-Peptids 257-AGPPRYSRI-265 in analoger Weise durch ein Ala in der C-terminalen Position zerstört wird. Deshalb sollten folgende m164-Mutanten generiert werden:

1. mCMV-m164-I265A (Funktionsverlust-Mutante)
2. mCMV-m164-A265I (Revertante)

Zusätzlich sollte eine Doppelmutante, in der beide Peptid-Sequenzen mutiert sind, sowie die korrespondierende Revertante hergestellt werden

1. mCMV-IE1-L176A-m164-I265A (Doppelmutante)
2. mCMV-IE1-A176L-m164-A265I (Doppelrevertante)

Schlussfolgerung: Es sollten Virusmutanten hergestellt werden in denen die Präsentation der dominanten Peptide durch Punktmutation der C-terminalen MHC-Klasse-I-Ankeramino-säure (X→A) - einzeln oder in Kombination - verhindert wird.

3.2 Strategie zur Herstellung rekombinanter mCMV-BAC-Plasmide mittels Zwei-Schritt-Rekombinationsverfahren in *E. coli*

Zur Herstellung von mCMV-Rekombinanten mit Punktmutationen im MHC-Klasse-I-Anker Codon der immundominanten Peptide IE1 und m164 mittels BAC-Technologie musste zuerst die jeweilige mutierte virale Sequenz mit angrenzenden viralen Homologien, flankierend zur Insertionsstelle im Virusgenom, in das *Shuttle*-Plasmid pST76K_SR (Pósfai et al., 1997; Borst et al., 2004) kloniert werden. Dieses Plasmid (siehe Abb. 3.3) besitzt ein temperatur-sensitives Replikon, das eine Replikation nur bei 30°C erlaubt. Weiterhin trägt es die Gene für die *RecA*-Rekombinase (ermöglicht die Mutagenese in *RecA*-negativen *E. coli* Stämmen, wie dem verwendeten DH10B), *nptII* (Neomycin-Phosphotransferase, *Kan^{Res}*), und *SacB* (codiert für das Exoenzym Levansaccharase aus *Bacillus subtilis*; Blomfield et al., 1991, Borst et al. 2004). Nach Transformation von *E. coli* (DH10B), die bereits das zu mutierende mCMV-BAC-Plasmid enthielten, mit dem jeweils klonierten *Shuttle*-Plasmid (Abb. 3.4 bzw. 3.5), entstand durch homologe Rekombination über eine der beiden flankierenden Homologien ein Cointegrat, welches die DNA-Sequenzen beider Plasmide beinhaltet. Da das Replikon von pST76K_SR im Gegensatz zum Replikon des mCMV-BAC-Plasmids nur bei 30°C replizieren kann, wurde es durch Kultivierung bei 43°C entfernt. Durch erneute homologe Rekombination zwischen zwei identischen flankierenden Homologien erfolgte die Auflösung der Cointegrate. Geschieht dies über die gleiche Homologie wie bei der ersten Rekombination, so entsteht wieder ein unverändertes mCMV-BAC-WT-Plasmid. Erfolgt die Rekombination jedoch über die andere der beiden Homologien, so erhält man ein rekombinantes mCMV-BAC-Plasmid, mit der entsprechenden Punktmutation im Codon der MHC-Klasse-I-Ankeraminosäure des IE1 bzw. m164-Peptids.

In einem letzten Schritt der Mutagenese erfolgte die Kultivierung der Bakterien auf LB-Agarplatten, denen 5% Saccharose zugesetzt war. Dadurch konnten Bakterien mit nicht-aufgelösten Cointegraten durch die von *SacB* kodierte Levansaccharase, welche Saccharose in die für Bakterien toxische Levansaccharose umsetzt (Blomfield et al., 1991), eliminiert werden. Infolgedessen konnte der Prozentsatz an erfolgreich mutierten mCMV-BAC-Plasmiden von 2,5% auf 50% (Wagner et al., 1999) erhöht werden. Diese Strategie zur Herstellung rekombinanter mCMV-BAC-Plasmide ist in Abb. 3.2 schematisch dargestellt und im Folgenden näher beschrieben.

Schlussfolgerung: Zur Herstellung der geplanten mCMV-Rekombinanten sollte das Zwei-Schritt-Rekombinationsverfahren zur Mutagenese herpesviraler Genome nach Messerle et al., 1997, Borst et al., 1999, 2004 sowie Wagner et al., 1999 in der Arbeitsgruppe etabliert werden.

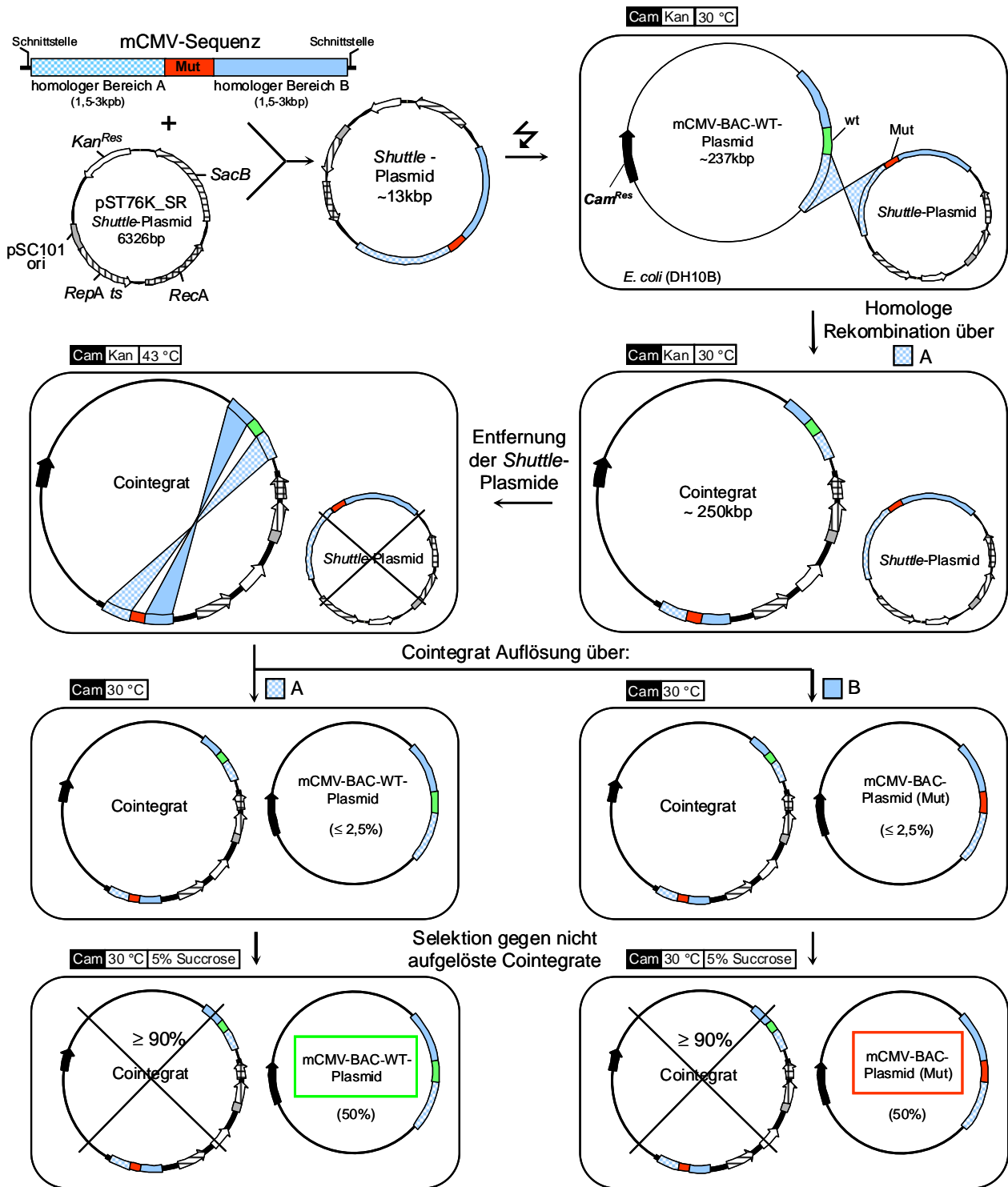


Abb. 3.2 Flussschema zur Strategie der Mutagenese von mCMV-BAC-Plasmiden mittels Zwei-Schritt-Rekombinationsverfahren. Das Shuttle-Plasmid pST76K_SR wird nach Subklonierung der mutierten viralen Sequenz (Mut, rot) mit angrenzenden Homolgien (homologer Bereich -A bzw. -B) zur Insertionsstelle im Virusgenom, in ein *E. coli* (DH10B), das bereits ein mCMV-BAC-WT-Plasmid besitzt, transformiert. Während der Inkubation bei 30°C wird das RecA-Protein exprimiert und Homologe Rekombination kann z.B. über die Homologien A erfolgen. Dadurch entsteht ein Cointegrat, auf das mit Chloramphenicol (Cam) und Kanamycin (Kan) selektiert werden kann. Anschließende Inkubation der Bakterien in Gegenwart von Cam und Kan bei 43°C verhindert die Replikation des Shuttle-Plasmids. Nach erneuter Inkubation bei 30°C in Gegenwart von Cam kann wieder eine homologe Rekombination zwischen den beiden Homologie-Paaren erfolgen. Verläuft dies erneut über Homologie A, so entsteht wieder ein mCMV-BAC-WT-Plasmid. Verläuft die Auflösung jedoch über Homologie B, so wird ein rekombinantes mCMV-BAC-Plasmid (Mut) mit der gewünschten Mutation erhalten. Zur Erhöhung der Ausbeute an aufgelösten Cointegraten wird mit 5% Saccharose gegen nicht-aufgelöste Cointegrate (mit *SacB*-Gen) selektiert.

3.2.1 Klonierung rekombinanter *Shuttle*-Plasmide

Voraussetzung für die Herstellung rekombinanter mCMV mittels Zwei-Schritt-Rekombinationsverfahren in *E. coli* war zunächst die Konstruktion der entsprechenden rekombinanten *Shuttle*-Plasmide. Diese sind zusammen mit den wichtigsten Ausgangs- und Zwischenkonstrukten in Abb. 3.4 und Abb. 3.5 schematisch dargestellt. Eine detaillierte Plasmidkarte des verwendeten *Shuttle*-Plasmids pST76K_SR (Pósfai et al., 1997, Borst et al., 2004) ist in Abb. 3.3 gezeigt.

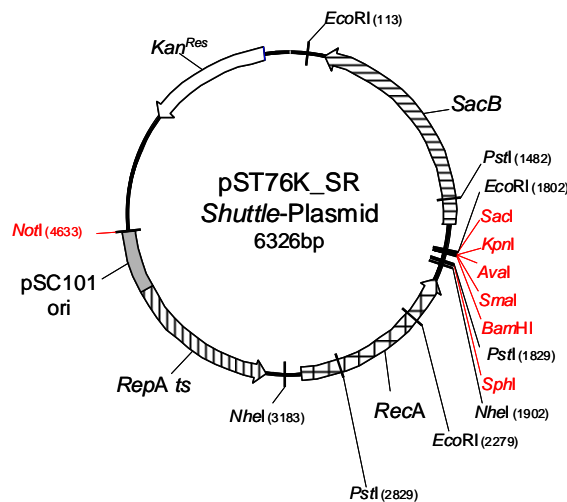


Abb. 3.3 Schematische Darstellung des *low-copy Shuttle*-Plasmids pST76K_SR. Dieses Plasmid trägt den temperatur-sensitiven Replikationsursprung pSC101 ori. Zusätzlich sind die Gene für die RecA-Rekombinase (*RecA*), *nptII* (*Kan^{Res}*), *RepA ts* (Replikations-Initiator-Protein mit Punktmutation: Temperaturen $\geq 37^{\circ}\text{C}$ führen zu einer Falsch-Faltung des RepA-Proteins und damit zur Inaktivierung des Proteins) und *SacB* (codiert für das Exoenzym Levan-Saccharase aus *B. subtilis*) enthalten. Restriktionsendonukleasen, die nur einmal in der Sequenz schneiden, sind rot dargestellt.

3.2.2 IE1-*Shuttle*-Plasmide

Zur Generierung der rekombinanten IE1-*Shuttle*-Plasmide wurde das bereits von Grzimek et al., 2001 beschriebene Plasmid pUCAMB als Basiskonstrukt verwendet. Es beinhaltet u. a. die WT-DNA-Sequenz des IE1-Peptids 181.020n bis 181.046n (Sequenzangabe nach Rawlinson et al., 1996), flankiert von weiteren mCMV-Sequenzen, und diente zur Herstellung des Plasmids pIE1:167-176L→A.

Zwischenkonstrukt **pIE1:167-176L→A** (siehe Abb. 3.4A) wurde generiert, um eine Punktmutation via Kombinations-PCR (siehe 2.10.4.2) in das Codon L[C₁T₁A] der C-terminalen MHC-Klasse-I-Ankeramino-säure des IE1-WT-Peptids einzufügen. Um die WT-DNA-Sequenz des IE1-Peptids zur Herstellung von pIE1:167-176L→A in pUCAMB zu deletieren und anschließend das mutierte Kombinations-PCR-Fragment (KF) **KF1** (Tabelle 3.2) mit dem punktmutierten Codon A[G₁C₁A] zu inserieren, wurde pUCAMB mit *HindIII* und *BclI* gespalten.

Dabei entstanden drei DNA-Fragmente: (7958bp; *Hind*III, *Bcl*I), II (4317bp; *Hind*III) und III (1005bp; *Hind*III, *Bcl*I).

Fragment III welches die WT-DNA-Sequenz des IE1-Peptids trug, wurde verworfen. Die Fragmente I und II dienten zusammen mit dem 1005bp **KF1** in einer dreier Ligation der Herstellung des Plasmids pIE1:167-176L→A.

Die Klonierung der verschiedenen IE1-*Shuttle*-Plasmide ist in Abb. 3.4B dargestellt.

Zur Konstruktion des *Shuttle*-Plasmids **pST76K_IE1Ala** wurde pIE1:167-176L→A mit *Bss*HII, *Hpa*I und *Fsp*I gespalten. Dabei diente *Fsp*I zur Zerstörung des Vektoranteils. Dadurch konnte ein 6523bp *Bss*HII/*Hpa*I Fragment, welches die Punktmutation L[CTA]176A[GCA] trägt, aus dem Gel eluiert werden. Anschließend wurden mit Hilfe der DNA-Polymerase-I (*Large-Klenow*-Fragment, siehe 2.9.9) glatte Enden hergestellt. Danach konnte das geglättete 6523bp *Bss*HII/*Hpa*I Fragment *blunt end* in das mit *Sma*I geöffnete *Shuttle*-Plasmid pST76K_SR ligiert werden.

Für die Klonierung des *Shuttle*-Plasmids **pST76K_IE1Leu**, welches die WT-DNA-Sequenz des IE1-Peptids enthält, diente wiederum das Plasmid pUCAMB als Basiskonstrukt. Ein durch Restriktion von pUCAMB mit den Enzymen *Bss*HII, *Hpa*I und *Fsp*I erzeugtes 6523bp *Bss*HII/*Hpa*I Fragment, das die WT-DNA-Sequenz des IE1-Peptids beinhaltet, wurde mittels Klenow-Polymerase geglättet und ebenfalls *blunt end* in die *Sma*I Schnittstelle des *Shuttle*-Plasmids pST76K_SR kloniert.

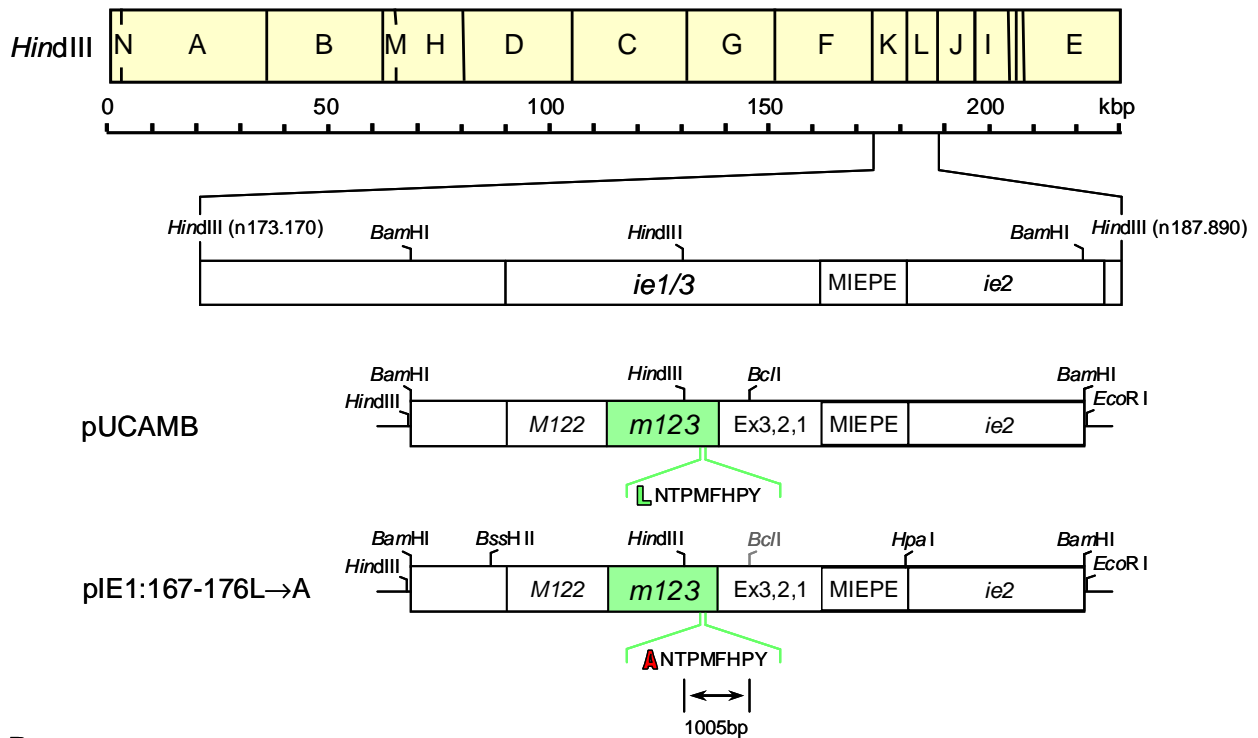
Zur Herstellung des *Shuttle*-Plasmids **pST76K_IE1Leu*** wurde zuerst ein 1471bp **KF2** (Tab 3.2) mit einer Punktmutation L[CTA]176L*[CTT] in der *Wobble*-Position des C-terminalen Codons der MHC-Klasse-I-Ankeraminoäure des IE1-Peptids generiert. Nach Restriktion von pST76K_IE1Leu mit *Apa*LI konnte das 1471bp *Apa*LI Fragment durch das 1471bp **KF2** ersetzt werden.

Das Plasmid pST76K_IE1Ala diente als Ausgangsplasmid zur Generierung des *Shuttle*-Plasmids **pST76K_IE1Phe**. Dazu wurde zunächst ein 1471bp **KF3** (Tab 3.2) hergestellt, welches das punktmutierte Codon A[GCA]176F[TTC] des IE1-Peptids trägt. Durch Restriktion von pST76K_IE1Ala mit *Apa*LI konnte ein 1471bp Fragment deletiert und im Anschluss durch das 1471bp **KF3** ersetzt werden.

PCR	Matrize	Primer1	Primer2	Annealing	A	Verdau	KF
1	pUCAMB	IE1ex2A	Nona-Ala-rev	55°C	A1 761bp	—	—
2	pUCAMB	Nona-Ala-f	IE1ex4	55°C	A2 342bp	—	—
3	A1 & A2	IE1ex2A	IE1ex4	60°C	A3 1081bp	<i>HindIII/BclI</i>	KF1 1005bp
4	pUCAMB	rIE1-revert	Nona-Leu-f*	58°C	A4 726bp	—	—
5	pUCAMB	Nona-Leu-r*	fIE1-revert	58°C	A5 952bp	—	—
6	A4 & A5	rIE1-revert	fIE1-revert	64°C	A6 1656bp	<i>ApaI</i>	KF2 1471bp
7	pST76K_ IE1Ala	rIE1-revert	fIE1-Phe	64°C	A7 723bp	—	—
8	pST76K_ IE1Ala	rIE1-Phe	fIE1-revert	64°C	A8 964bp	—	—
9	A7 & A8	rIE1-revert	fIE1-revert	64°C	A9 1656bp	<i>ApaI</i>	KF3 1471bp

Tab. 3.2 Auflistung der Kombinations-PCRs zur Herstellung der IE1-Plasmide. PCR-Oligonukleotide für die gerichtete PCR-Mutagenese (siehe 2.8.1.2), Kombinations-PCR (siehe 2.10.4.2), und standardisiertes *ProofStart* PCR-Profil (siehe 2.10.4.1). A, Amplifikat; KF, Kombinations-PCR-Fragment

A



B

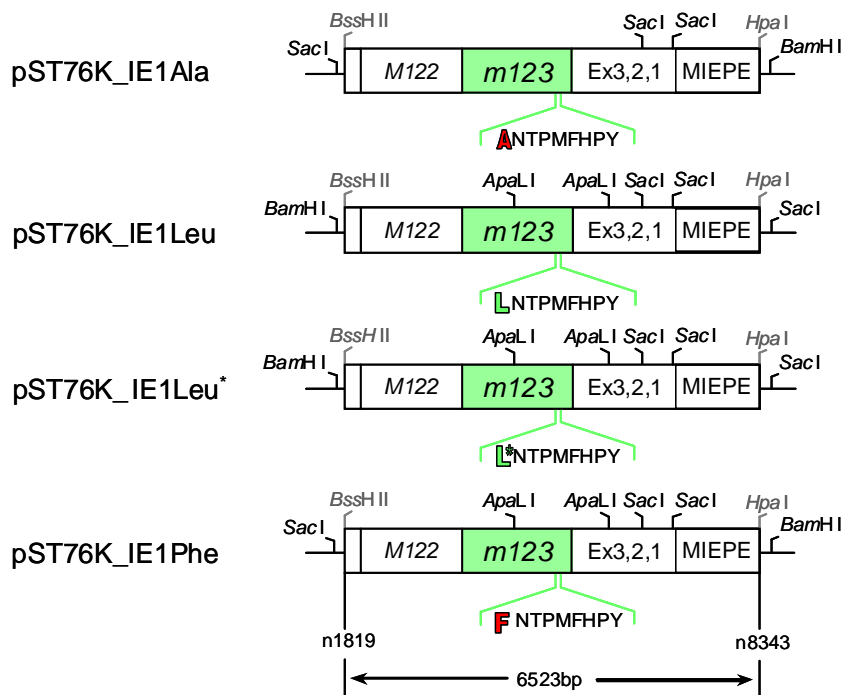


Abb. 3.4 Konstruktion rekombinanter IE1-Plasmide. A: Physikalische *Hind*III-Karte des WT-mCMV-Genoms mit Vergrößerung des K- und L-Fragmentes. Nukleotidpositionen (n) beziehen sich auf die WT-mCMV-Sequenz nach Rawlinson et al. 1996. Der in der IE-Region lokalisierte ORF *m123* ist grün hervorgehoben. Gezeigt sind das Basiskonstrukt pUCAMB mit der WT-IE1-Peptid-Sequenz und das Zwischenkonstrukt pIE1:167-176L→A mit der mutierten C-terminalen MHC-Klasse-I-Ankeramino-säure des IE1-Peptids L[CTA]176A[GCA]. Die Restriktionsschnittstellen *Hind*III und *Bcl*I dienen zur Deletion eines 1005bp Fragmentes, welches die WT-DNA-Sequenz des IE1-Peptids in pUCAMB beinhaltet. Ein mittels Kombinations-PCR hergestelltes 1005bp Fragment mit Mutation der Ankeramino-säure (L176A) des IE-Peptids wurde anschließend in die deletierte Region inseriert und hierdurch das Plasmid pIE1:167-176L→A generiert. Hellgrau gekennzeichnete Restriktionsschnittstellen sind durch Klonierungsschritte in den Konstrukten an der jeweiligen Position nicht mehr vorhanden. B: Schematische Darstellung der IE1-Shuttle-

Plasmide mit der zur homologen Rekombination verwendeten 6523bp mCMV-Region. Die C-terminalen MHC-Klasse-I-Ankeraminoacids X (WT-Aminosäure, grün; Mutation, rot) des IE1-Peptides sind hervorgehoben: pST76K_IE1Ala (A[GCA]), pST76K_IE1Leu (L[CTA]), pST76K_IE1Leu* (L*[CTT]) und pST76K_IE1Phe (F[TTC]). Die für Klonierungsschritte verwendeten Restriktionsschnittstellen sind eingezeichnet. Die Orientierung des 6523bp *Inserts* im Vektor pST76K_SR (nicht dargestellt) ist durch die *SacI* und *BamHI* Schnittstellen des Vektors gegeben.

3.2.3 m164-Shuttle-Plasmide

Im Gegensatz zur Herstellung der IE1-Shuttle-Plasmide gab es für die Konstruktion der m164-Shuttle-Plasmide nicht die Möglichkeit auf bereits klonierte Konstrukte zurückzugreifen. Die direkte Klonierung eines geeigneten DNA-Fragments mit hinreichend großen, viralen-Sequenzen (1,5-2,5kbp zu jeder Seite) beiderseits flankierend zur WT-DNA-Sequenz des m164-Peptides 222.855n bis 222.881n (Holtappels et al., 2002a, c; Sequenzangabe nach Rawlinson et al., 1996) aus mCMV-BAC-WT-Plasmid-DNA (C3X-Plasmid-DNA) konnte aufgrund der mCMV-Genomgröße nicht realisiert werden. Klonierungsrelevante Restriktionsenzymstellen, die auch in der *multiple cloning site* (MCS) des Shuttle-Plasmids pST76K_SR vorhanden waren, führten nicht zu den benötigten Fragmenten es konnten diese aufgrund der entstandenen Fragmentvielfalt nicht in einem Agarose-Gel getrennt werden. Um dieses Problem zu umgehen, wurde eine PCR-vermittelte Subklonierung der benötigten viralen-Sequenzen mit C3X-Plasmid-DNA als Matrize durchgeführt. Durch die Wahl der PCR-Oligonukleotide war es möglich, ein geeignetes Klonierungsfragment zu generieren, das von zwei neuen, zur MCS des Shuttle-Plasmids pST76K_SR kompatiblen, Erkennungssequenzen flankiert wurde.

Zur Konstruktion des Basiskonstruktes **pDrive_m164ausC3X** (siehe Abb. 3.5A) wurde eine spezielle Klonierungs-PCR für PCR-Amplifikate >2kbp (siehe 2.10.4.2, spezielles PCR-Profil: 2', 95°C; [10'', 94°C; 1', 58,5°C; 5', 68°C]x15; [10'', 94°C; 1', 60,5°C; 5', 68°C]x20) mit der Oligonukleotid-Kombination m164ausBAC-for (siehe 2.8.1.2, mit *HpaI* Erkennungs-Sequenz) und m164ausBAC-rev (siehe 2.8.1.2, mit *SphI* Erkennungs-Sequenz) sowie C3X als Matrizen-DNA durchgeführt. Das erzeugte 5258bp PCR-Amplifikat beinhaltete die WT-DNA-Sequenz des m164-Peptides mit den erforderlichen flankierenden mCMV-Sequenzen und konnte nach Gel-Aufreinigung (siehe 2.9.6) direkt über 3'A-Überhänge in den speziellen PCR-Klonierungsvektor *pDrive Cloning Vector* (siehe 2.9.10.1) kloniert werden.

Die Klonierung der Shuttle-Plasmide **pST76K_m164Ala** und **pST76K_m164Ile** ist in Abb. 3.5B dargestellt.

Dafür war es zunächst notwendig verschiedene Zwischenkonstrukte herzustellen, um darauf folgende Klonierungsschritte zu vereinfachen bzw. überhaupt erst zu ermöglichen.

Für die Klonierung des Zwischenkonstruktes 1 **pBlue_m164ausC3X** (siehe Abb. 3.5A) wurde ein 5279bp *EcoRI*-Fragment aus pDrive_m164ausC3X in den zuvor mit *EcoRI* geöffneten Vektor *pBluescript II KS* (siehe 2.8.3) subkloniert. Zwischenkonstrukt 1 diente zur Herstellung des Zwischenkonstruktes 2 pBlue_m164ausC3X(I→A).

In das Zwischenkonstrukt 2 **pBlue_m164ausC3X(I265A)** (siehe Abb. 3.5A) wurde mittels Kombinations-PCR (siehe 2.10.4.2) eine Punktmutation A[GCC] in das Codon der C-terminalen MHC-Klasse-I-Ankeraminoäure des m164-WT-Peptids I[ATC] inseriert. Der Verdau von Zwischenkonstrukt 1 mit *NcoI* und *AgeI* führte zur Deletion der WT-DNA-Sequenz des m164-Peptids. Das durch Kombinations-PCR erzeugte 1291bp **KF4** (Tabelle 3.3), mit der gewünschten Punktmutation im Codon I[ATC]265A[GCC] im m164-Peptid, wurde in das zuvor mit *NcoI* und *AgeI* geöffnete Zwischenkonstrukt 1 ligiert und somit das Plasmid pBlue_m164ausC3X(I265A) erhalten.

Das *Shuttle*-Plasmid **pST76K_m164Ala** resultierte schließlich aus der Subklonierung eines 5242bp *HpaI* und *SphI* Fragments aus pBluem164ausC3X(I→A) in das mit *SmaI* und *SphI* geöffnete *Shuttle*-Plasmid pST76K_SR.

Die Generierung des *Shuttle*-Plasmids **pST76K_m164Ile** erfolgte analog zur Herstellung von pST76K_m164Ala, allerdings unter Verwendung eines 5242bp *HpaI* und *SphI* Fragments aus pBlue_m164ausC3X.

PCR	Matrize	Primer1	Primer2	Annealing	A	Verdau	KF
10	pBlue_m164ausC3X	m164 Mut-rev	m164 Ala-for	65°C	A10 493bp	—	—
11	pBlue_m164ausC3X	m164 Ala-rev	m164 Mut-for	65°C	A11 901bp	—	—
12	A10 & A11	m164 Mut-rev	m164 Mut-for	65°C	A12 1370bp	<i>AgeI/NcoI</i>	KF4 1291bp

Tab. 3.3 Kombinations-PCR für die Klonierung von pBluem164ausC3X(I→A). PCR-Oligonukleotide für die gerichtete PCR Mutagenese (siehe 2.8.1.2), Kombinations-PCR (siehe 2.10.4.2), und standardisiertes *ProofStart* PCR Profil (siehe 2.10.4.1). A, Amplifikat; KF, Kombinations-PCR-Fragment.

Schlussfolgerung: Die Klonierung der für die homologe Rekombination benötigten *Shuttle*-Plasmide konnte erfolgreich realisiert werden. Damit standen für IE1 die *Shuttle*-Plasmide pST76K_IE1Ala, pST76K_IE1Leu, pST76K_IE1Leu* und pST76K_IE1Phe sowie für m164 die *Shuttle*-Plasmide pST76K_m164Ala und pST76K_m164Ile zur Verfügung.

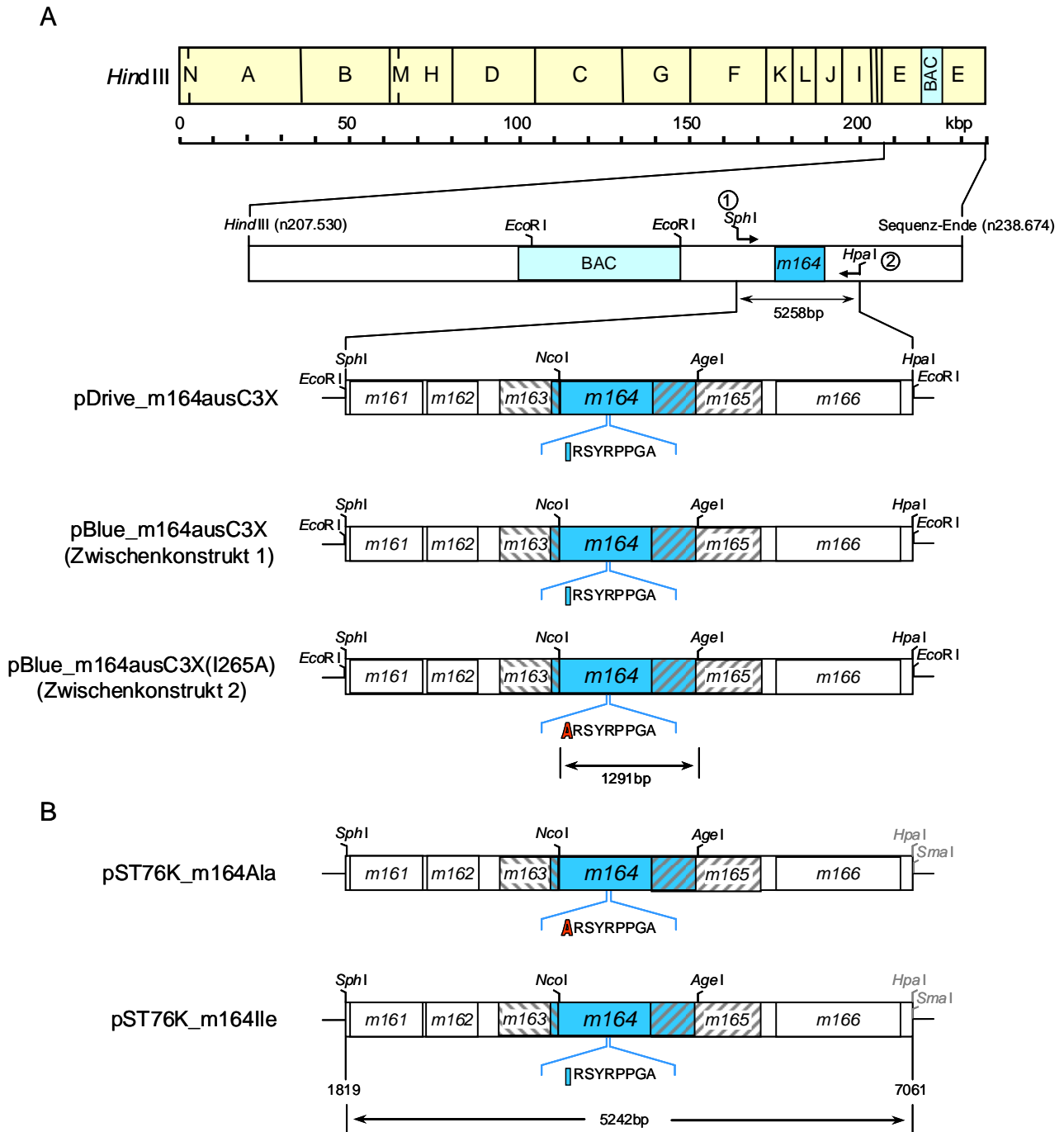


Abb. 3.5 Konstruktion rekombinanter m164-Plasmide. A: Physikalische *Hind*III-Karte des mCMV-BAC-WT-Genoms mit Vergrößerung des terminalen E-Fragments und dem darauf lokalisierten BAC-Vektoranteil (hellblau) sowie dem ORF *m164* (blau). Nukleotidpositionen (n) beziehen sich auf die mCMV-BAC-WT-Sequenz. Weiterhin sind die ORFs *m163* und *m165* (beide grau schraffiert), welche am 3'-bzw. 5'-Ende mit dem ORF *m164* überlappen (grau/blau schraffiert), dargestellt. Gezeigt ist das Basiskonstrukt pDrive_m164ausC3X, mit der WT-m164-Peptid-Sequenz, Zwischenkonstrukt 1 pBlue_m164ausC3X und Zwischenkonstrukt 2 pBlue_m164ausC3X(I265A) mit der mutierten C-terminalen MHC-Klasse-I-Ankeraminosäure der m164-Peptid Sequenz I[ATC]265A[GCC]. Ein mit den PCR-Oligonukleotiden ① und ② amplifiziertes 5258bp PCR-Fragment aus dem mCMV-BAC-WT-Plasmid (C3X) diente zur Herstellung von pDrive_m164ausC3X. Nach Umklonierung über die Restriktionsschnittstellen *Eco*RI aus pDrive_m164ausC3X wurde das Plasmid pBlue_m164ausC3X erzeugt. Restriktionsschnittstellen *Nco*I und *Age*I dienen zur Deletion eines 1291bp Fragmentes, welches die WT-Sequenz des m164-Peptids in pBlue_m164ausC3X trägt. Ein mittels Kombinations-PCR hergestelltes 1291bp Fragment mit Mutation der C-terminalen Klasse-I Ankeraminosäure (I265A) des m164-Peptids wurde anschließend in die deletierte Region inseriert und somit das Plasmid pBlue_m164ausC3X(I265A) erhalten. B. Schematische Darstellung

der m164-*Shuttle*-Plasmide mit der zur homologen Rekombination verwendeten 5242bp *m164*-Region. Die C-terminalen MHC-Klasse-I-Ankeraminoaciden X (WT-Aminosäure, blau; Mutation, rot) des m164-Peptids sind hervorgehoben: pST76K_m164Ala (A[GCC]), pST76km164Ile (I[ATC]). Die für Klonierungsschritte verwendeten Restriktionsschnittstellen sind eingezeichnet. Hellgraue Restriktionsschnittstellen sind nicht mehr funktionell.

3.3 Charakterisierung rekombinanter *Shuttle*-Plasmide

Bevor die einzelnen *Shuttle*-Plasmide zur homologen Rekombination verwendet werden konnten, mussten die hergestellten Klone sowohl einem Restriktionsenzymverdau als auch einer Sequenz-Analyse unterzogen werden. Durch die Restriktions-Analyse sollte gezeigt werden, dass alle Klone das gewünschte DNA-*Insert* enthielten, bei gleichzeitiger Feststellung seiner Orientierung. Die anschließende Sequenz-Analyse sollte auf molekularer Ebene die inserierten Punktmutationen im Codon der jeweiligen C-terminalen MHC-Klasse-I-Ankeraminoacide des IE1- bzw. m164-Peptids bestätigen.

3.3.1 Restriktions-Analyse der IE1-*Shuttle*-Plasmide

Die Restriktions-Analyse der IE1-*Shuttle*-Plasmide erfolgte mit den Restriktionsenzymen *SacI* und *XbaI*. Die daraus resultierenden theoretischen Fragmentgrößen sind in Tabelle 3.4 aufgelistet. Nach Gel-elektrophoretischer Auftrennung (siehe Abb. 3.6) der gespaltenen Plasmide konnten alle zu erwartenden DNA-Fragmente nachgewiesen werden. Die durch Restriktions-Analyse erbrachte Information über die Orientierung der klonierten Fragmente im Vektor ist in Abb. 3.4 berücksichtigt.

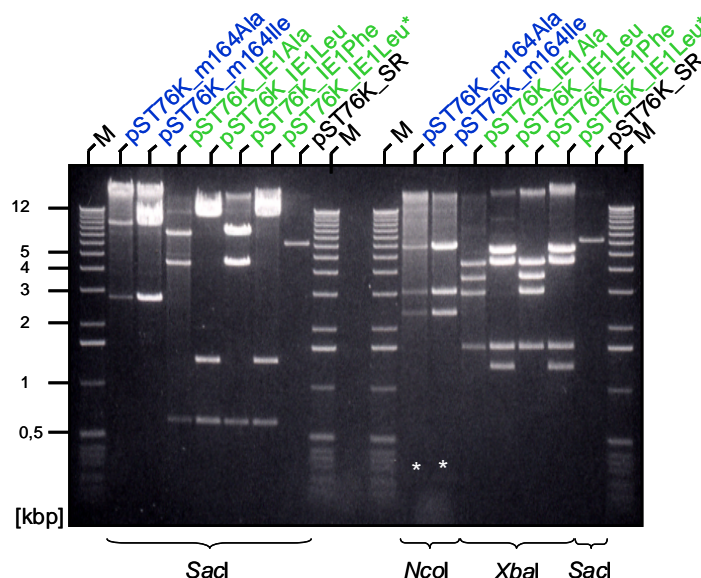


Abb. 3.6 Gel-elektrophoretische Auftrennung der hergestellten *Shuttle*-Plasmide nach Restriktionsenzymverdau Die entstandenen Banden entsprechen genau den jeweils erwarteten Fragmentgrößen (Vgl. Tabelle 3.4 bzw. 3.5). Als Kontrolle wurde das linearisierte *Shuttle*-Plasmid

(pST76K_SR, schwarz) ohne Insert aufgetragen. Sternchen, schwache Bandenintensitäten. Spur M, 1kbp Marker. IE1-*Shuttle*-Plasmide sind grün und m164-*Shuttle*-Plasmide sind blau beschriftet.

Plasmid-Bezeichnung	Größe [kbp]	Fragmente [kbp]	
		SacI	XbaI
pST76K_IE1Ala	12,849	7,69; 4,54; 0,611	4,5; 3,66; 3,06; 1,64
pST76K_IE1Leu	12,849	10,85; 1,39; 0,611	5,41; 4,5; 1,64; 1,31
pST76K_IE1Leu*	12,849	10,85; 1,39; 0,611	5,41; 4,5; 1,64; 1,31
pST76K_IE1Phe	12,849	7,69; 4,54; 0,611	4,5; 3,66; 3,06; 1,64

Tab. 3.4 Restriktions-Analyse der klonierten IE1-*Shuttle*-Plasmide.

3.3.2 Restriktions-Analyse der m164-*Shuttle*-Plasmide

Die Restriktions-Analyse der m164-*Shuttle*-Plasmide erfolgte mit den Restriktionsenzymen SacI und NcoI. Die daraus resultierenden theoretischen Fragmentgrößen sind in Tabelle 3.5 aufgelistet. Nach Gel-elektrophoretischer Auftrennung (siehe Abb. 3.6) der gespaltenen m164-*Shuttle*-Plasmide wurden auch in diesen Klonen alle erwarteten DNA-Fragmente experimentell bestätigt.

Plasmid-Bezeichnung	Größe [kbp]	Fragmente [kbp]	
		SacI	NcoI
pST76K_m164Ala	11,513	8,78; 2,73	5,8; 3,05; 2,42; 0,236
pST76K_m164Ile	11,513	8,78; 2,73	5,8; 3,05; 2,42; 0,236

Tab. 3.5 Restriktions-Analyse der klonierten m164 *Shuttle*-Plasmide.

3.3.3 Sequenz-Analyse der IE1-*Shuttle*-Plasmide

Mit Hilfe der Restriktions-Analyse war es möglich die erfolgreiche Klonierung der IE1-*Shuttle*-Plasmide nachzuweisen. Eine Aussage über die Richtigkeit der erzeugten Punktmutationen im Codon der C-terminalen MHC-Klasse-I-Ankeramino-säure des IE1-Peptids war damit jedoch nicht möglich. Deshalb musste dieser Nachweis auf molekularer Ebene durch Sequenzierung erbracht werden (siehe Abb. 3.7).

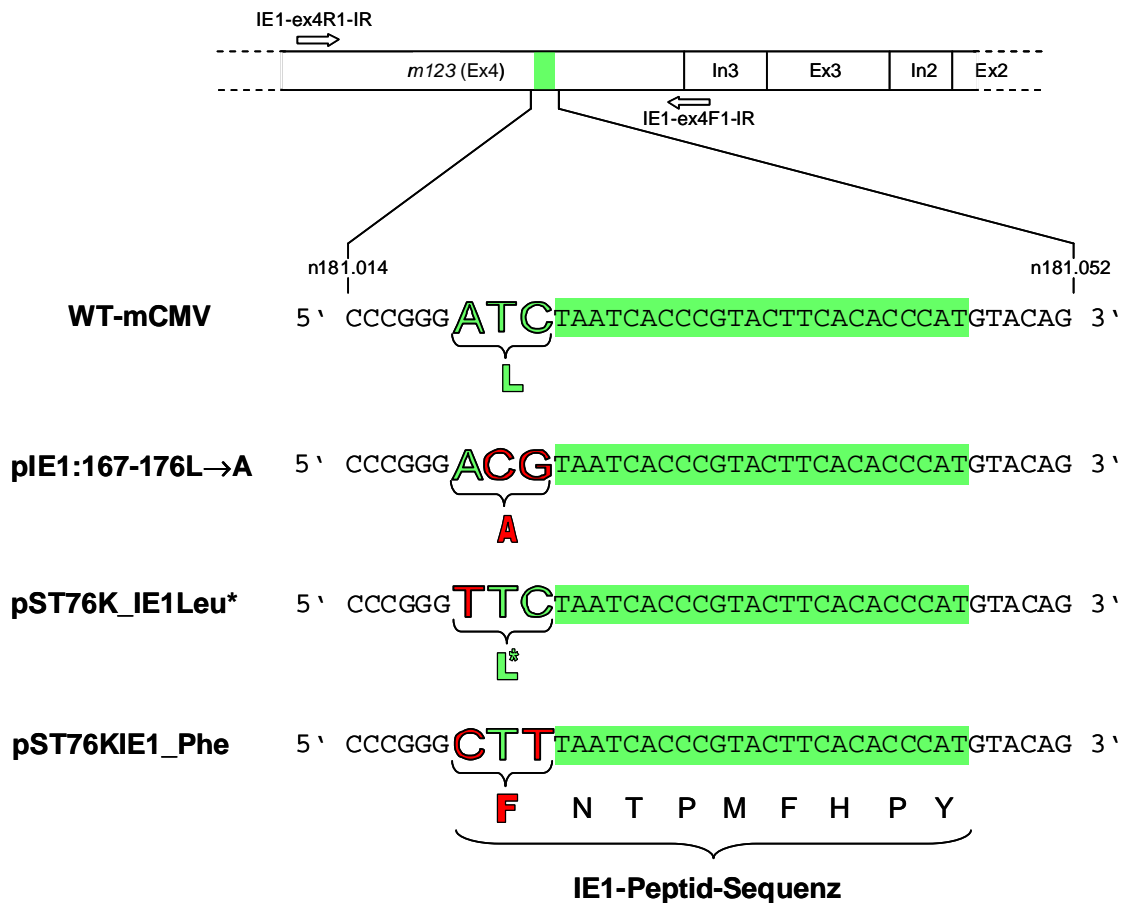


Abb. 3.7 Nachweis der eingefügten Punktmutationen durch Sequenzierung rekombinanter IE1-Plasmide. Gezeigt ist ein Ausschnitt der IE-Region mit den Exons (Ex) 4,3 und 2 sowie den Introns (In) 2 und 3 des WT-mCMV-Genoms. Weiße Pfeile: Position der verwendeten Sequenzier-Oligonukleotide IE1-ex4R1-IR und IE1-ex4F1-IR. Vergrößerung der IE1-Peptid-Region. Grüne Box: DNA-Sequenz des IE1-Peptids von Codon 1-8. Kleine geschweifte Klammer: Position 9 des Codons der C-terminalen Ankeraminosäure im IE1-Peptid, Nucleotide im WT-Codon mit grünen Buchstaben, mutierte Nucleotide in den entsprechenden *Shuttle*-Plasmiden mit roten Buchstaben gekennzeichnet. Weiterhin ist die Aminosäure-Sequenz des IE1-Peptids 168-YPHFMPNTX-176 mit Vergrößerung der C-terminalen MHC-Klasse-I-Ankeraminosäure X (WT-Aminosäure, grün; Mutation, rot) dargestellt. Nucleotidpositionen (n) beziehen sich auf die mCMV-Sequenz nach Rawlinson et al. 1996. Ohne Maßstab.

Die Sequenz-Analyse erfolgte mit den Plasmiden pIE1:167-176L→A, pST76K_IE1Leu* und pST76K_IE1Phe (siehe Abb. 3.7). Zur Sequenzierung wurde jeweils von 10 verschiedenen Klonen Plasmid-DNA isoliert und diese als Matrize in je eine Sequenzier-Reaktion (siehe 2.10.4.3) mit den Sequenzier-Oligonucleotiden IE1-ex4F1-IR bzw. IE1-ex4R1-IR (siehe 2.8.1.1, *Annealing*: 58°C) eingesetzt. Bei >95% der sequenzierten Klone konnten die mittels Kombinations-PCR eingefügten Punktmutationen (L[CTA]176A[GCA], A[GCA]176L*[CTT] und A[GCA]176F[TTTC]) sowohl auf dem *sense* (IE1-ex4F1-IR) als auch auf dem *antisense* (IE1-ex4R1-IR) Strang bestätigt werden.

3.3.4 Sequenz-Analyse der m164-*Shuttle*-Plasmide

Im Unterschied zur Herstellung der IE1-*Shuttle*-Plasmide gab es für die Klonierung der m164-*Shuttle*-Plasmide nicht die Möglichkeit auf bereits klonierte Konstrukte zurückzugreifen. Deshalb musste zur Generierung der m164-*Shuttle*-Plasmide ein PCR-vermitteltes Verfahren mit C3X-Plasmid-DNA als Matrize angewandt werden, um schließlich die benötigten m164-*Shuttle*-Plasmide zu erhalten (siehe 3.2.3).

Dabei wurde das zu klonierende 5242bp PCR-Amplifikat mit einer hoch affinen *proofreading* DNA-Polymerase und speziellem PCR-Protokoll (siehe 2.10.4.1) generiert. Die verwendete *ProofStart* DNA-Polymerase besitzt eine mehr als 10fach höhere Kopiergenauigkeit im Vergleich zu klassischen Taq-DNA-Polymerasen (Kobsch et al., 2001). Damit sollte der Einbau falscher Nukleotide während der PCR und somit das Auftreten von methodenbedingten Mutationen verhindert werden. Dies war essentiell, weil Mutationen auf DNA-Ebene u. U. zu fehlerhaften Proteinfunktionen oder unvollständigen Proteinen führen können. Deshalb musste durch Sequenzierung der gesamten mittels PCR klonierten DNA sichergestellt werden, dass während der PCR keine unerwünschten Mutationen erzeugt wurden.

Die Sequenzierung des klonierten PCR-Fragments im *Shuttle*-Plasmid pST76K_m164Ala wurde aufgrund der Größe des zu sequenzierenden Bereichs von 5242bp auf den codogenen Strang beschränkt und in Zusammenarbeit mit der Firma *Genterprise* (Mainz) nach dem Prinzip des *Primer-Walkings* (Sambrook & Russel, 2001) durchgeführt. Da keine exakten Sequenzinformationen für das C3X-Plasmid existierten, musste auch der für die PCR-vermittelte Subklonierung verwendete Sequenzbereich dieses Plasmids sequenziert werden und fungierte dann als C3X-Referenzsequenz.

Das *Alignment* der sequenzierten Sequenzbereiche von pST76K_m164Ala und C3X zeigte, dass während der PCR keine zusätzlichen Mutationen entstanden sind. Zudem konnte die mittels Kombinations-PCR inserierte Punktmutation I[ATC]265A[GCC] im Codon der C-terminalen MHC-Klasse-I-Ankeraminosäure des m164-Peptids im Plasmid pST76K_m164Ala eindeutig nachgewiesen werden. Der m164-Peptid-flankierende DNA-Bereich wurde, wie in Abb. 3.8 dargestellt, zusätzlich mit den Sequenzier-Oligonukleotiden m164-seq-rev bzw. m164-seq-for (siehe 2.8.1.1, *Annealing*: 58°C) sequenziert. Auch in dieser Sequenzierung konnten die zuvor beschriebenen Ergebnisse erneut bestätigt werden. Damit konnte durch Sequenzierung auch auf molekularer Ebene eindrucksvoll die fehlerfreie PCR-vermittelte Klonierung des 5242bp Fragments nachgewiesen werden.

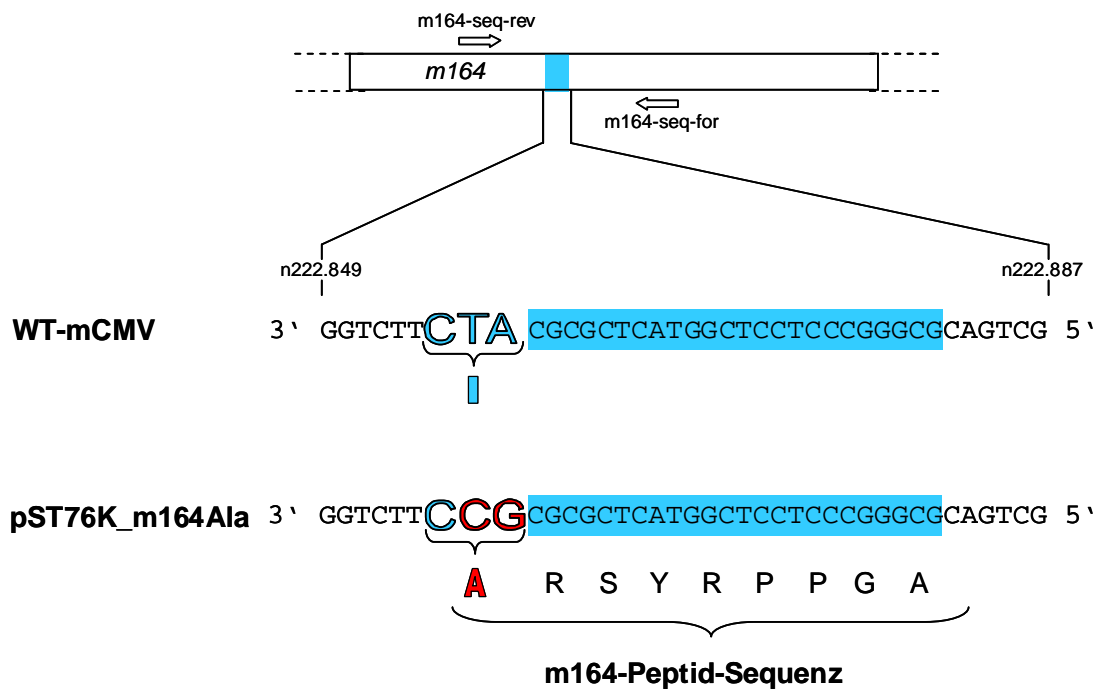


Abb. 3.8 Nachweis der eingefügten Punktmutation durch Sequenzierung von pST76K_m164Ala. Gezeigt ist ein Ausschnitt der m164-Region des WT-mCMV-Genoms. Weiße Pfeile: Positionen der verwendeten Sequenzier-Oligonukleotide m164-seq-rev und m164-seq-for. Vergrößerung der m164-Peptid-Region. Blaue Box: DNA-Sequenz des m164-Peptids von Codon 1-8. Kleine geschweifte Klammer: Position 9 des Codons der C-terminalen Ankeramino-säure im m164-Peptid, Nukleotide im WT-Codon mit blauen Buchstaben, mutierte Nukleotide in dem Plasmid pST76K_m164Ala mit roten Buchstaben gekennzeichnet. Weiterhin ist die Aminosäure-Sequenz des m164-Peptids 257-AGPPRYSRX-265 mit Vergrößerung der C-terminalen MHC-Klasse-I-Ankeramino-säure X (WT-Aminosäure, blau; Mutation, rot) dargestellt. Nukleotidpositionen (n) beziehen sich auf die mCMV-Sequenz nach Rawlinson et al. 1996.

Zur Feststellung der Sequenz-Homologie zwischen C3X und WT-mCMV für den mittels PCR klonierten m164-Bereich von 220.441n bis 225.678n (Alle Sequenzangaben beziehen sich auf die mCMV-Sequenz nach Rawlinson et al., 1996) wurden weitere *Alignments* durchgeführt. Dabei konnte im ORF m164 der C3X-Sequenz bei Nukleotidposition 222.666 ein Basenaustausch CTG → CTA festgestellt werden, der allerdings keine Auswirkung auf die m164-Proteinsequenz besitzt, da die Aminosäure Leu erhalten bleibt. Jedoch führt dieser Nukleotidaustausch zu einer Inaktivierung der *Bsp*MI Schnittstelle (5' ACCTGC(N)₄ 3') im ORF m164 innerhalb der C3X-Sequenz.

Weiterhin wurde in der C3X-Sequenz bei Position n220.599 ein zusätzliches A detektiert. Die daraus resultierende Verschiebung des offenen Leserahmens um ein Nukleotid ergibt im Vergleich zur WT-mCMV-Sequenz einen um 39bp verkürzten ORF m161 (siehe Tabelle 3.6).

Bemerkung: Relevante *Alignments* befinden sich im Anhang 6.4. Zusätzlich können die Original Sequenzierdaten der Firma *Genterprise*, Mainz auf der im Anhang 6 beigefügten CD eingesehen werden.

ORF	Start	Ende	Größe [bp]	Protein [aa]	DNA-Homologie	Protein-Homologie
<i>m161</i> Smith	221.149n	220.472n	678	225	93%	85%
<i>m161</i> BAC	221.150n	220.512	639	212		

Tab. 3.6 Zusammenfassung des Alignments von WT-mCMV mit mCMV-BAC-WT für den ORF *m161*. Nukleotidpositionen beziehen sich auf die mCMV-Sequenz nach Rawlinson et al., 1996.

Schlussfolgerung: Durch Sequenzierung der klonierten *Shuttle*-Plasmide ließen sich die generierten Punktmutationen in dem jeweiligen Codon der C-terminalen MHC-Klasse-I-Ankeraminosäure des IE1- bzw. m164-Peptids eindeutig nachweisen. Die *Shuttle*-Plasmide können somit zur homologen Rekombination im Verlauf der BAC-Mutagenese eingesetzt werden.

3.4 Herstellung rekombinanter mCMV-BAC-Plasmide

Nach der erfolgreichen Klonierung und Charakterisierung der IE1- bzw. m164-*Shuttle*-Plasmide konnte jetzt die Strategie zur Herstellung rekombinanter mCMV-BAC-Plasmide mittels homologer Rekombination im Zwei-Schritt-Rekombinationsverfahren, wie unter 3.2 beschrieben und wie in Abb. 3.2 gezeigt, durchgeführt werden. Die technischen Details zur Herstellung der nachfolgend beschriebenen mCMV-BAC-Plasmide können dem Kapitel 2.11.1 entnommen werden.

3.4.1 Herstellung rekombinanter mCMV-BAC-IE1-Plasmide

Zur Generierung der Mutante **mCMV-BAC-IE1-L176A** (Funktionsverlust-Mutante) wurde das *Shuttle*-Plasmid pST76K_IE1Ala (siehe 3.2.2) verwendet, welches eine Punktmutation L[CTA]176A[GCA] (181.020n bis 181.022n; Sequenzangabe nach Rawlinson et al., 1996) im Codon der MHC-Klasse-I-Ankeraminosäure des IE1-Peptids trägt. Nach Transformation von pST76K_IE1Ala in elektrokompetente *E. coli*, die bereits das zu mutierende C3X-Plasmid enthielten, konnten nach erfolgreicher homologer Rekombination rekombinante mCMV-BAC-Klone isoliert werden.

Bemerkung: Die im Folgenden beschriebenen Punktmutationen beziehen sich immer auf die Position der C-terminalen MHC-Klasse-I-Ankeraminosäure des IE1-Peptids (181.020n bis 181.022n, s. o.).

Die Herstellung der genetisch markierten Revertante **mCMV-BAC-IE1-A176Leu*** (*Wobble*-Revertante) erfolgte unter der Verwendung des *Shuttle*-Plasmids pST76K_IE1Leu* (siehe 3.2.2). Dieses *Shuttle*-Plasmid ermöglichte die Revertierung der Punktmutation A[GCA]176L*[CTT] im

mCMV-BAC-IE1-L176A-Plasmid. Gleichzeitig wurde auf diese Weise eine genetische Markierung der *Wobble*-Position im Codon der C-terminalen MHC-Klasse-I-Ankeramino­säure Leu des IE1-Peptids erzielt. Durch die genetische Markierung ist eine Unterscheidung zwischen mCMV-BAC-WT und mCMV-BAC-IE1-A176L* auf molekularer Ebene möglich.

Weiterhin wurde die Rekombinante **mCMV-BAC-IE1-A176L** (authentische Revertante) generiert. Dazu wurde das *Shuttle*-Plasmid pST76K_IE1Leu (siehe 3.2.2) in elektrokompetente *E. coli*, die bereits das mCMV-BAC-IE1-L176A-Plasmid enthielten, transformiert. Die daraus resultierende homologe Rekombination führte ebenfalls zu einer Revertierung der Punktmutation A[GCA]176L[CTA] im IE1-Peptid. Das generierte mCMV-BAC-Plasmid trägt jedoch im Unterschied zu mCMV-BAC-IE1-A176L* die WT-DNA-Sequenz im Codon der C-terminalen MHC-Ankeramino­säure.

Abschließend erfolgte die Herstellung von **mCMV-BAC-IE1-A176F** (funktionelles IE1-Analogon). Hier wurde die Revertierung der Punktmutation A[GCA]176F[TTC] innerhalb des IE1-Peptids durch Verwendung des *Shuttle*-Plasmids pST76K_IE1Phe (siehe 3.2.2) erzielt. Eine Übersicht der generierten mCMV-BAC-IE1-Plasmide gibt Tabelle 3.7 wieder.

Shuttle-Plasmid	Ausgangs-BAC-Plasmid	Mutation	IE1-BAC-Plasmide
pST76K_IE1Ala	C3X	L[CTA]176A[GCA]	mCMV-BAC-IE1-L176A
pST76K_IE1Leu*	mCMV-BAC-IE1-L176A	A[GCA]176L*[CTT]	mCMV-BAC-IE1-A176L*
pST76K_IE1Leu	mCMV-BAC-IE1-L176A	A[GCA]176L[CTA]	mCMV-BAC-IE1-A176L
pST76K_IE1Phe	mCMV-BAC-IE1-L176A	A[GCA]176F[TTC]	mCMV-BAC-IE1-A176F

Tab. 3.7 Übersicht der generierten IE1-BAC-Plasmide. Die aufgeführten Mutationen beziehen sich auf das Codon der C-terminalen MHC-Klasse-I-Ankeramino­säure des IE1-Peptids von mCMV (181.020n bis 181.022n, Rawlinson et al., 1996).

3.4.2 Herstellung rekombinanter mCMV-BAC-m164-Plasmide

Das rekombinante Plasmid **mCMV-BAC-m164-I265A** (Funktionsverlust-Mutante) wurde durch Transformation des *Shuttle*-Plasmids pST76K_m164Ala (siehe 3.2.3) in elektrokompetente *E. coli*, die bereits das C3X-Plasmid enthielten, und anschließender homologer Rekombination hergestellt. mCMV-BAC-m164-I265A trägt eine Punktmutation I[ATC]265A[GCC] im Codon der C-terminalen MHC-Klasse-I-Ankeramino­säure des m164-Peptids.

Die Generierung von **mCMV-BAC-m164-A265I** (Revertante) erfolgte mit dem *Shuttle*-Plasmid pST76K_m164Ile (siehe 3.2.3). Dieses Plasmid ermöglichte die Revertierung A[GCC]176I[ATC]

der Punktmutationen im mCMV-BAC-m164-I265A-Plasmid. Eine Übersicht der generierten m164-BAC-Plasmide ist in Tabelle 3.8 gezeigt.

Shuttle-Plasmid	Ausgangs-BAC-Plasmid	Mutation	m164-BAC-Plasmide
pST76K_m164Ala	C3X	I[ATC]265A[GCC]	mCMV-BAC-m164-I265A
pST76K m164Ile	mCMV-BAC-m164-I265A	A[GCC]265I[ATC]	mCMV-BAC-m164-A265I

Tab. 3.8 Übersicht der generierten m164-BAC-Plasmide. Die aufgeführten Mutationen beziehen sich auf das Codon der C-terminalen MHC-Klasse-I-Ankeramino­säure des m164-Peptids von mCMV (222.855n bis 222.857n, Rawlinson et al., 1996).

3.4.3 Herstellung von Doppelmutante und Doppelrevertante

Die **Doppelmutante** (mCMV-BAC-IE1-L176A-m164-I265A) beinhaltet eine gezielte Auslöschung der beiden immundominanten Peptide (IE1 und m164) durch Punktmutationen in den jeweiligen Codons der C-terminalen MHC-Klasse-I-Ankeramino­säuren. Durch Transformation des Plasmids pST76K_IE1Ala (siehe 3.2.2) in elektrokompetente *E. coli*, die bereits das mCMV-BAC-m164-I265A-Plasmid enthielten, konnten nach erfolgreicher homologer Rekombination, die gewünschten BAC-Klone isoliert werden.

Die Konstruktion der **Doppelrevertante** (mCMV-BAC-IE1-A176L-m164-A265I) musste hingegen in zwei Schritten erfolgen, da eine direkte Revertierung der Punktmutationen in beiden antigenen Peptiden durch eine Co-Transformation der *Shuttle*-Plasmide pST76K_IE1Leu (siehe 3.2.2) und pST76K_m164Ile (siehe 3.2.3) konzeptionell nicht möglich war, weil eine kontrollierbare homologe Rekombination nur mit jeweils einem *Shuttle*-Plasmid und einem mCMV-BAC-Plasmid durchgeführt werden kann.

Deshalb musste die Revertierung in zwei Schritten durchgeführt werden. Zuerst wurde die Doppelmutante mit dem *Shuttle*-Plasmid pST76K_IE1Leu transformiert, um den Zwischenklon mCMV-BAC-IE1-A176L-m164-I265A zu erhalten. Dadurch konnte die Punktmutation im IE1-Peptid (A[GCA]176L[CTA]) revertiert werden.

Nach Isolierung des Zwischenklons und Kompetenz-Induktion, konnte dieser zur Revertierung der Punktmutation im m164-Peptid (A[GCC]265I[ATC]) mit dem *Shuttle*-Plasmid pST76K_m164Ile transformiert werden. Die für die Herstellung von Doppelmutante und Doppelrevertante verwendeten *Shuttle*- und BAC-Plasmide sind in Tabelle 3.9 zusammengefasst dargestellt

Shuttle-Plasmid	Ausgangs-BAC-Plasmid	Mutation	BAC-Plasmide
pST76K_IE1Ala	mCMV-BAC-m164-I265A	IE1: L[CTA]176A[GCA] ¹ m164: I[ATC]265A[GCC]	Doppelmutante
pST76K_IE1Leu	Doppelmutante	IE1: A[GCA]176L[CTA] ¹ m164: I[ATC]265A[GCC]	mCMV-BAC-IE1-A176L-m164-I265A²
pST76K_m164Ile	mCMV-BAC-IE1-A176L-m164-I265A ²	IE1: A[GCA]176L[CTA] m164: A[GCC]265I[ATC] ¹	Doppelrevertante

Tab. 3.9 Übersicht zur Herstellung der Doppelmutante und Doppelrevertante. Die aufgeführten Mutationen beziehen sich auf das Codon der C-terminale Ankeraminosäure MHC-Klasse-I des IE1 bzw. m164-Peptids von mCMV (181.020n bis 181.022n bzw. 222.855n bis 222.857n, Rawlinson et al., 1996). ¹ In diesem Schritt neu in das Plasmid eingefügte Mutation. ² Zwischenklon.

Schlussfolgerung: Die Generierung rekombinanter mCMV-BAC-Plasmide mittels Zwei-Schritt-Rekombinationsverfahren nach Messerle et al., 1997, Borst et al., 1999, 2004 sowie Wagner et al., 1999, konnte erfolgreich in der Arbeitsgruppe etabliert werden. Die mit dieser Methode generierten mCMV-BAC-Plasmide sind in den Tabellen 3.7 bis 3.9 aufgeführt.

3.4.4 Molekulare Charakterisierung der hergestellten mCMV-BAC-Plasmide

Bevor die hergestellten rekombinanten mCMV-BAC-Plasmide zur Virusrekonstitution in MEF transfiziert werden konnten, musste eine sorgfältige molekulare Charakterisierung erfolgen. Dabei dienten die durchgeführten Restriktions-Analysen zum einen der Überprüfung der Integrität des mCMV-Genoms innerhalb der mCMV-BAC-Plasmide nach erfolgreicher homologer Rekombination in *E. coli*, und zum anderen der Kontrolle der mCMV-BAC-DNA-Qualität. Dagegen konnte der Nachweis über eine erfolgreiche Generierung der Punktmutationen in den beiden antigenen Peptiden IE1 und m164 auf Ebene der DNA nur durch Sequenzierung erbracht werden.

3.4.4.1 Restriktions-Analyse

Im Folgenden ist am Beispiel von mCMV-BAC-IE1-L176A (Funktionsverlust-Mutante) die Restriktions-Analyse exemplarisch beschrieben. Alle übrigen mCMV-BAC-Klone wurden in gleicher Weise analysiert.

Das mCMV-BAC-Plasmid besitzt Sequenz-Wiederholungen von 533bp flankierend zur BAC-Vektor-Sequenz. Diese dienen zur Entfernung der bakteriellen-Sequenzen (BAC-Vektoranteil) nach Virusrekonstitution in eukaryotischen Zellen (siehe 3.4.5.1). Deshalb können auch in *RecA*-negativen *E. coli* Stämmen (DH10B) spontane Rekombinationsereignisse zwischen den internen viralen Sequenz-Wiederholungen sowie zwischen viralen und bakteriellen-Sequenzen auftreten und damit zum Verlust des mCMV-Genoms aus dem mCMV-BAC-Plasmid führen. Infolgedessen

musste nach der erfolgreichen homologen Rekombination die Integrität des mCMV-Genoms im mCMV-BAC-Plasmid überprüft werden. Dazu wurde von bis zu max. 15 Kanamycin-sensitiven Klonen aus Schritt VII (siehe 2.11.1) Plasmid-DNA (BAC-Minipräparation) isoliert und anschließend mit *EcoRI* verdaut. In Abb. 3.9A ist die Auftrennung der Plasmid-DNA von 9 BAC-Klonen nach Restriktion mit *EcoRI* gezeigt. Die Klone #5 und #9 zeigten nur die für den BAC-Vektor charakteristischen Banden von 1,93kbp und 6,45kbp. In den übrigen Klonen (#1-#4 und #6-#8) blieben die viralen Genomfragmente stabil erhalten. Die Sequenzierung der Klone #1-#4 und #6-#8 ergab in 5 Klonen die erfolgreiche Sequenzierung der Punktmutation. Die isolierte BAC-DNA dieser 5 Klone wurde zur Bestätigung der Integrität des mCMV-Genoms und der DNA-Qualität erneut mit *EcoRI* verdaut (Abb. 3.9B).

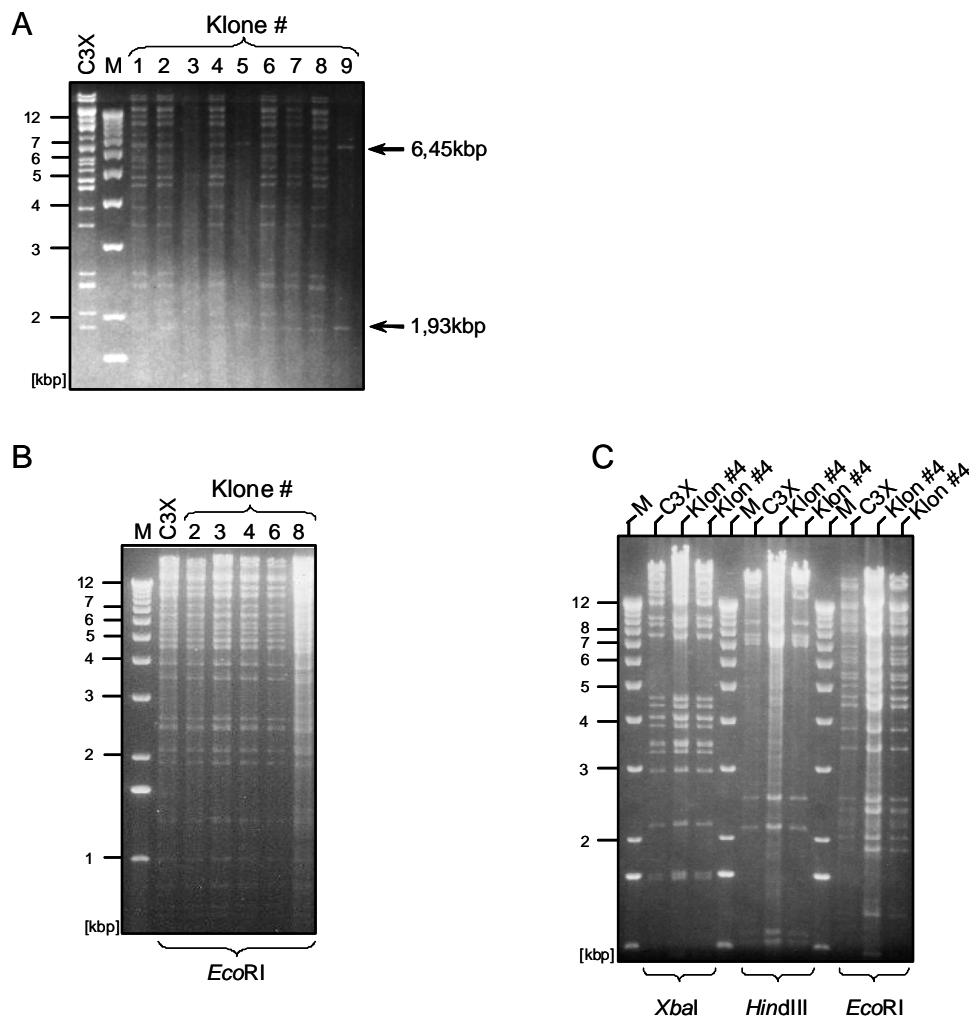


Abb. 3.9 Integrität des mCMV-BAC-Genoms nach homologer Rekombination in *E. coli* (DH10B). Die Überprüfung ist am Beispiel von mCMV-BAC-IE1-L176A gezeigt. Die Auftrennung der mCMV-BAC-DNA erfolgte in 0,6%igen Agarose-Gelen. Spur M, 1kbp Marker; Spur C3X, mCMV-BAC-WT-Plasmid-DNA. A: Mit *EcoRI* verdaute BAC-DNA (BAC-Minipräparation). Bis auf die BAC-Klone #5 und #9 zeigten die übrigen BAC-Klone das für das mCMV-BAC-WT-Genom charakteristische Genomfragment-Muster. In den BAC-Klonen #5 und #9 kam es während der homologen Rekombination zum Verlust der mCMV-Sequenz und nur die charakteristischen *EcoRI*-Banden (1,93kbp und 6,45kbp), der BAC-Vektor-Sequenz blieben erhalten. B: Restriktionsenzym-Muster der mit *EcoRI* verdauten BAC-Maxipräparations-DNA der mutierten Klone #2, #3, #4, #6, #8 sowie C3X. C: Die Virusrekonstitution erfolgte im nachfolgenden Schritt mit der gereinigten BAC-DNA aus Klon #4. Deshalb wurde diese BAC-DNA zur näheren Charakterisierung mit den Restriktionsenzymen *EcoRI*, *HindIII* und *XbaI* verdaut.

Wie aus Abb. 3.9B zu entnehmen ist, zeigten alle getesteten Klone das charakteristische mCMV-Genomfragment-Muster. Weil die im nachfolgendem Schritt durchgeführte Virusrekonstitution (siehe 3.2.5) mit gereinigter BAC-Maxipräparations-DNA aus Klon #4 erfolgte, wurde diese zur detaillierteren Charakterisierung nochmals mit *EcoRI* und zusätzlich mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *XbaI* verdaut (Abb. 3.9C). Die entstandenen Bandenmuster bestätigten nochmals eindrucksvoll die Integrität des mCMV-Genoms innerhalb des mCMV-BAC-Plasmids. Da die durchgeführten Restriktionen mit *EcoRI*, *HindIII* und *XbaI* im Vergleich zwischen Klon #4 und C3X keine erkennbaren Unterschiede im Bandenmuster aufweisen, kann angenommen werden, dass während der homologen Rekombination keine viralen Gensegmente deletiert wurden.

Abb. 3.10 zeigt eine Übersicht aller generierten rekombinanten mCMV-BAC-Plasmide nach Kontrollrestriktionen mit *EcoRI*, *HindIII* und anschließender Auftrennung in einem 0,7%igem Agarose-Gel. Wie aus dieser Abbildung sehr gut zu sehen ist, gab es sowohl innerhalb der verschiedenen rekombinanten BAC-Plasmide als auch im Vergleich zu dem mitgeführten C3X-Plasmid keinerlei Unterschiede in den entstandenen Bandenmustern. Auch hier können aufgrund der Bandenhomogenität größere Deletionen im viralen Genom ausgeschlossen werden. Dies bestätigt noch einmal die Integrität des mCMV-Genoms innerhalb des mCMV-BAC-Plasmids sowie die Zuverlässigkeit des etablierten Zwei-Schritt-Rekombinationsverfahrens. Die jeweils isolierte BAC-Maxipräparations-DNA dieser Klone konnte somit zur Virusrekonstitution (siehe 3.4.5) verwendet werden.

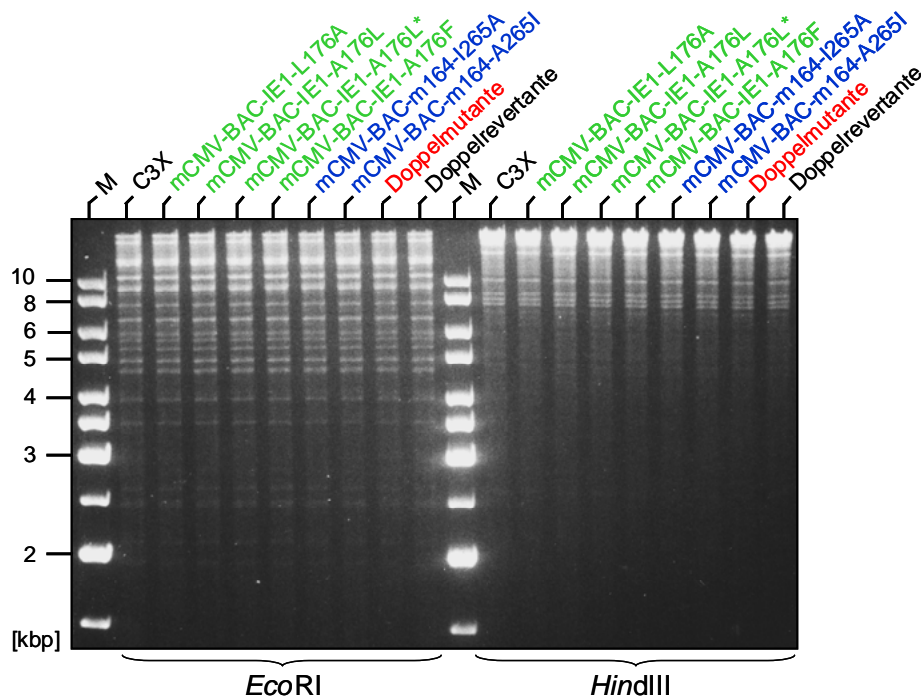


Abb. 3.10 Gel-elektrophoretische Auftrennung der generierten rekombinanten mCMV-BAC-Plasmide nach Kontrollrestriktionen. 0,7%iges Agarose-Gel; Spur M, 1kbp Marker; Spur C3X, mCMV-BAC-WT-Plasmid. Die isolierte, mit *EcoRI* bzw. *HindIII*, verdaut mCMV-BAC-Plasmid-DNA (BAC-Maxipräparation) zeigte für alle hergestellten mCMV-BAC-Klone die für das mCMV-Genom charakteristischen Genomfragmente.

3.4.4.2 Sequenz-Analyse

Die Identifikation der rekombinanten mCMV-BAC-Plasmide mit den gewünschten Punktmutationen im Codon der C-terminalen MHC-Klasse-I-Ankeramino-säure des IE1- bzw. m164-Peptids konnte nur durch Sequenzierung erfolgen. Das jeweilige in die Sequenzier-Reaktion (siehe 2.10.4.3) einzusetzende PCR-Fragment musste zuvor aus BAC-Minipräparations-DNA (siehe 2.10.1.2) amplifiziert werden. Dieser Amplifikationsschritt war essentiell, da die DNA-Qualität der BAC-Minipräparation für eine direkte Sequenzierung unzureichend ist. Dabei diente das Oligonukleotid-Paar IE1ex2A und IE1ex4 (siehe 2.8.1.2, *Annealing*: 60°C) zur Amplifikation eines 1081bp PCR-Fragments, welches die DNA-Sequenz des IE1-Peptids beinhaltete. Mit dem Oligonukleotid-Paar m164Exprf./m164Expr. (siehe 2.8.1.2, *Annealing*: 55°C) wurde analog ein 1281bp PCR-Fragment, welches die entsprechende DNA-Sequenz des m164-Peptids enthielt, amplifiziert. Um die Fehlerrate der PCR zu minimieren wurden alle PCR-Amplifizierungen mit einer speziellen *proofreading* DNA-Polymerase, die eine hohe Kopiergenauigkeit besitzt, und speziellem PCR-Protokoll (siehe 2.10.4.1) durchgeführt.

Die Sequenzierungen der IE1-PCR-Produkte erfolgte mit den Oligonukleotiden IE1-ex4F1-IR bzw. IE1-ex4R1-IR (siehe 2.8.1.1). m164 spezifische PCR-Produkte wurden mit den Oligonukleotiden m164-seq-for bzw. m164-seq-rev (siehe 2.8.1.1) sequenziert. Da aufgrund der homologen Rekombination der statistisch erwartete Prozentsatz an erfolgreich mutierten mCMV-BAC-Plasmiden bei 50% liegt, wurden für jede herzustellende BAC-Rekombinante, nach erfolgreicher Kontrollrestriktion (siehe 3.4.4.1), mehrere BAC-Klone ($6 \leq x \leq 12$) sequenziert. Dies stellte sicher, dass immer eine ausreichende Zahl an Mutanten nachgewiesen werden konnte. Um die Genauigkeit der Sequenzierung zu erhöhen, wurde bei allen positiv identifizierten BAC-Rekombinanten zusätzlich auch der *antisense* Strang sequenziert. Pro Sequenzier-Ansatz ließen sich im Mittel ca. 400 Nukleotide lesen.

Zur Visualisierung der inserierten Punktmutationen auf DNA-Ebene sind in den folgenden Abbildungen (siehe 3.11 bis 3.13) exemplarisch Ausschnitte der Sequenziergele von positiv identifizierten mCMV-BAC-Klonen gezeigt.

Die Ergebnisse der Sequenzierungen sind für alle analysierten BAC-Klone in Tabelle 3.10 am Ende dieses Kapitels zusammenfassend dargestellt. Wie dieser Tabelle zu entnehmen ist, war es möglich, für alle herzustellenden mCMV-BAC-Rekombinanten mehrere positive Klone zu identifizieren.

Schlussfolgerung:

1. Die Integrität des mCMV-Genoms innerhalb der generierten mCMV-BAC-Plasmide konnte mittels Restriktions-Analyse bestätigt werden.
2. Die Nukleotid-genaue Integration der jeweils inserierten Punktmutationen im Codon der C-terminalen MHC-Klasse-I-Ankeramino-säure des IE1- bzw. m164-Peptids innerhalb der mCMV-BAC-Sequenz konnte durch Sequenz-Analyse verifiziert werden.

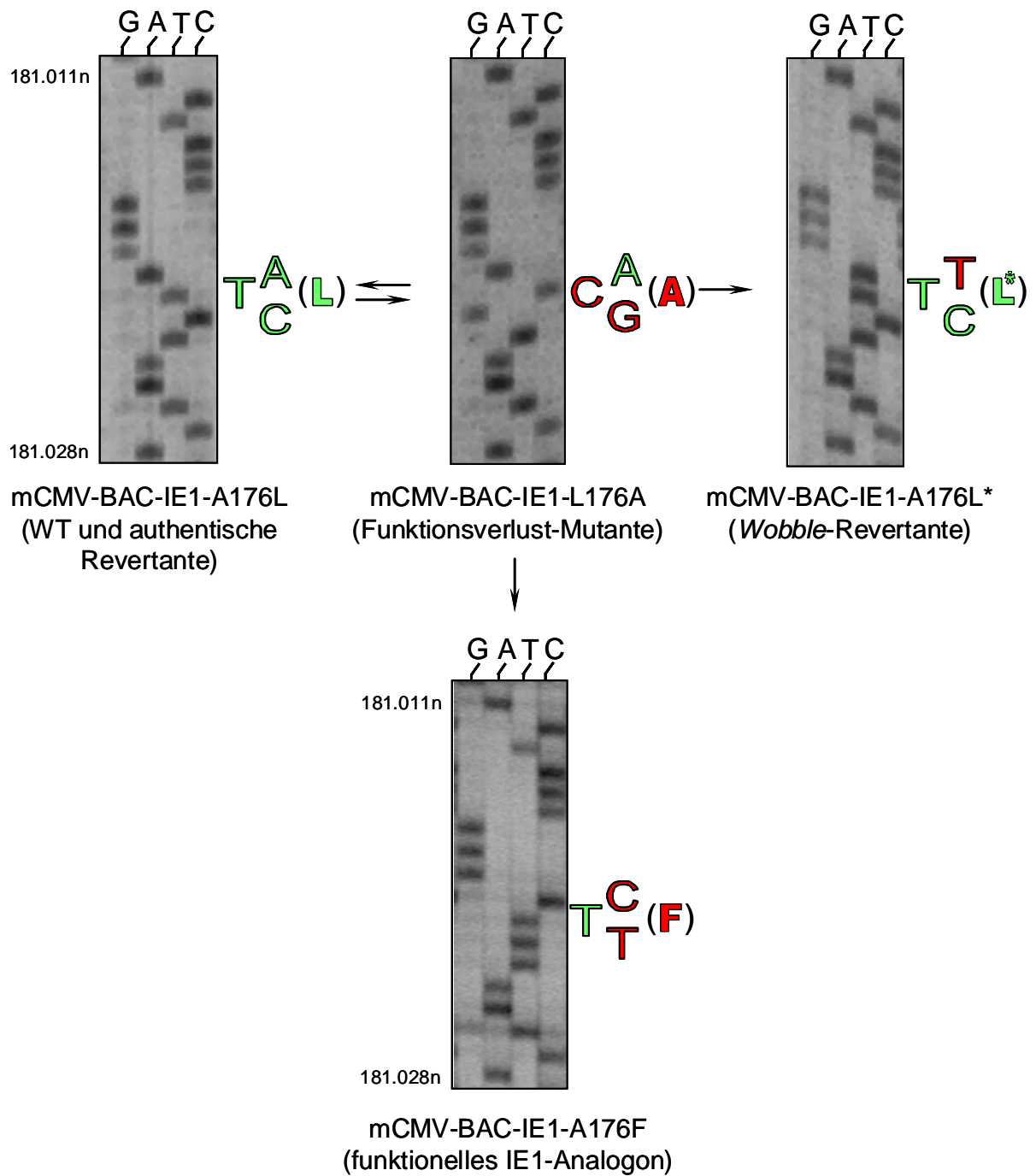


Abb. 3.11 Nachweis der korrekt eingeführten Punktmutationen durch Sequenzierung von mCMV-BAC-IE1-Plasmiden. Die Identifikation der rekombinanten mCMV-BAC-Plasmide mit den gewünschten Punktmutationen erfolgte durch Sequenzierung mehrerer BAC-Klone ($6 \leq x \leq 12$). Diese Abbildung zeigt exemplarisch Sequenzier-Ergebnisse, die mit dem Sequenzier-Oligonukleotid IE1-ex4F1-IR erzielt worden sind. Mutierte Nukleotide im Codon der C-terminalen MHC-Klasse-I-Ankeramino-säure des IE1-Peptids sind mit roten Buchstaben, WT-Nukleotide mit grünen Buchstaben gekennzeichnet. Weiterhin sind die resultierenden Aminosäuren gezeigt (grün WT, rot Mutante). Die Pfeile zwischen den Sequenziergel-Ausschnitten geben den Verlauf der Mutanten- bzw. Revertanten-Herstellung an (siehe Abb. 3.2). Nukleotidpositionen (n) beziehen sich auf die mCMV-Sequenz nach Rawlinson et al., 1996.

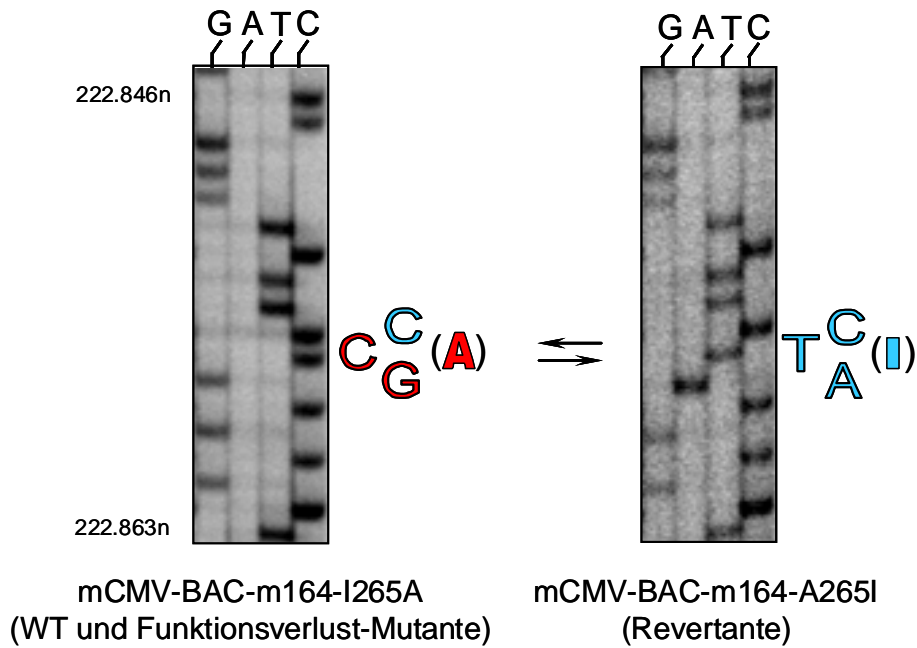


Abb. 3.12 Nachweis der korrekt eingeführten Punktmutationen durch Sequenzierung von mCMV-BAC-m164-I265A und mCMV-BAC-m164-A265I. Die Identifikation der rekombinanten mCMV-BAC-Plasmide mit den gewünschten Punktmutationen erfolgte durch Sequenzierung mehrerer BAC-Klone ($6 \leq x \leq 12$). Diese Abbildung zeigt exemplarisch Sequenzier-Ergebnisse, die mit dem Sequenzier-Oligonukleotid m164-seq-for erzielt worden sind. Mutierte Nukleotide im Codon der C-terminalen MHC-Klasse-I-Ankeramino-säure des m164-Peptids sind mit roten Buchstaben, WT Nukleotide mit blauen Buchstaben gekennzeichnet. Weiterhin sind die resultierenden Aminosäuren gezeigt (blau WT, rot Mutante). Die Pfeile zwischen den Sequenziergel-Ausschnitten geben den Verlauf der Mutanten- bzw. Revertanten-Herstellung an (siehe Abb. 3.2). Nukleotidpositionen (n) beziehen sich auf die mCMV-Sequenz nach Rawlinson et al., 1996.

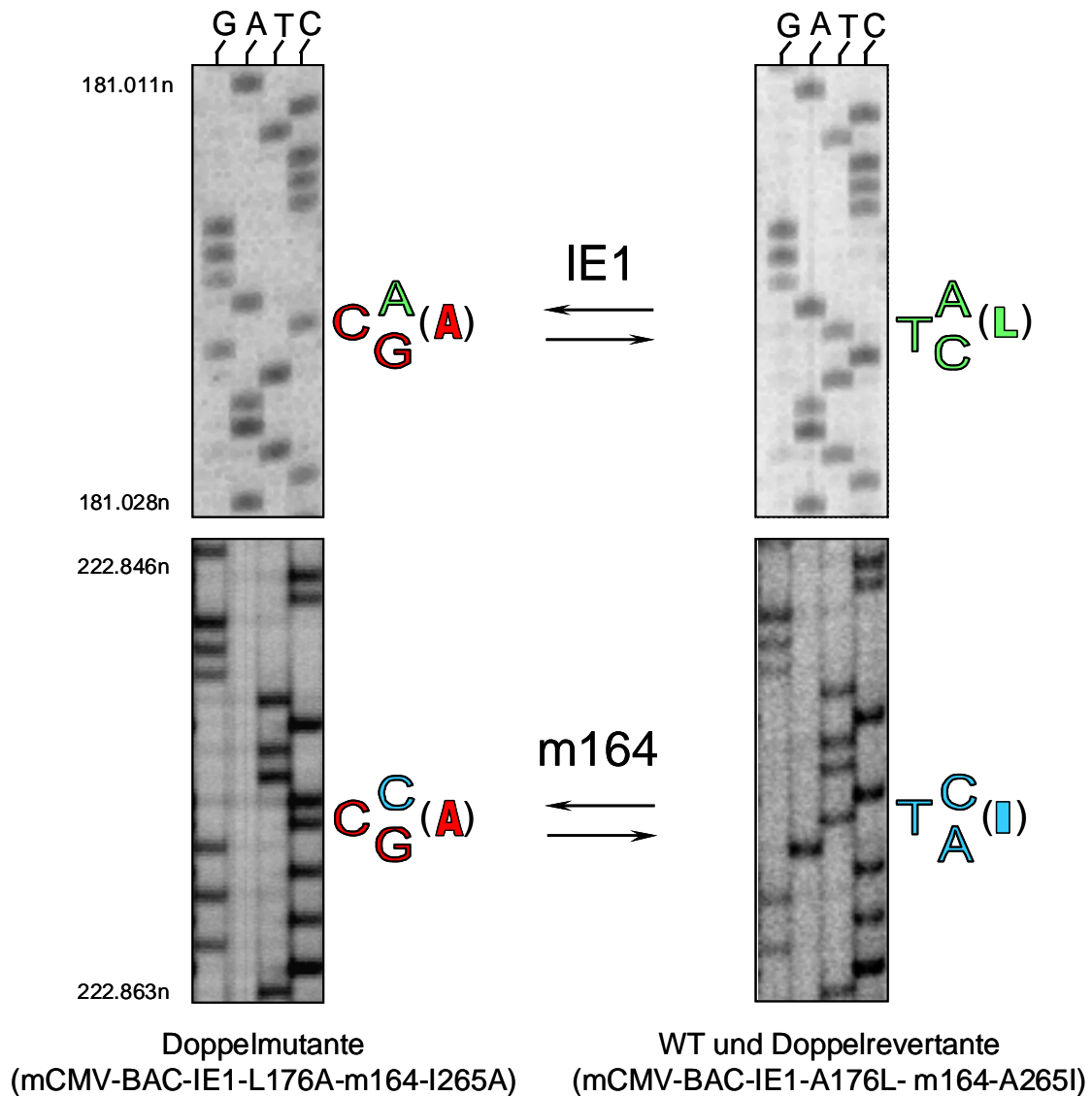


Abb. 3.13 Nachweis der korrekt inserierten Punktmutationen in der Doppelmutante und Doppelrevertante. Die Identifikation der rekombinanten mCMV-BAC-Plasmide mit den gewünschten Punktmutationen erfolgte durch Sequenzierung mehrerer BAC-Klone ($6 \leq x \leq 12$). Diese Abbildung zeigt exemplarisch Sequenzier-Ergebnisse, die mit den Sequenzier-Oligonukleotiden m164-seq-for und IE1-ex4F1-IR erzielt worden sind. Mutierte Nukleotide im Codon der C-terminalen MHC-Klasse-I-Ankeraminosäure des IE1 bzw. m164-Peptids sind mit roten Buchstaben, WT Nukleotide mit grünen (*ie1*) bzw. blauen (*m164*) Buchstaben gekennzeichnet. Weiterhin sind die resultierenden Aminosäuren gezeigt (grün IE1-WT, blau m164-WT, rot Mutante). Die Pfeile zwischen den Sequenziergel-Ausschnitten geben den Verlauf der Mutanten- bzw. Revertanten-Herstellung an (Vgl Abb. 3.2). Nukleotidpositionen (n) beziehen sich auf die mCMV-Sequenz nach Rawlinson et al., 1996.

BAC-Klone	analysierte Klone	positiv	Abbildung
mCMV-BAC-IE1-L176A	7	5/7	3.11
mCMV-BAC-IE1-A176L	10	7/10	
mCMV-BAC-IE1-A176L*	10	4/10	
mCMV-BAC-IE1-A176F	9	6/9	
mCMV-BAC-m164-I265A	12	5/12	3.12
mCMV-BAC-m164-A265I	12	8/12	
Doppelmutante	9	5/9	3.13
Doppelrevertante	11	11/11	

Tab. 3.10 Zusammenfassung der Sequenz-Analyse nach erfolgreicher homologer Rekombination.

3.4.5 Herstellung rekombinanter mCMV aus mCMV-BAC-Plasmid-DNA

Zur Rekonstitution der rekombinanten Viren (Prinzip siehe Abb. 3.14) wurden 50 bis 70% konfluente MEF mit dem jeweils zu transfizierenden mCMV-BAC-Plasmid inkubiert (siehe 2.4.4.1). Aufgrund der großen Viskosität der hochmolekularen BAC-DNA konnte keine photometrische DNA Quantifizierung durchgeführt werden. Deshalb war es auch nicht möglich, eine bestimmte Konzentration an BAC-Plasmid-DNA pro Transfektionsansatz einzusetzen. Um dennoch aussagekräftige Transfektionsergebnisse zu erzielen, wurden die in Tabelle 3.11 aufgeführten Volumina an BAC-DNA eingesetzt.

Die ersten Virus-Plaques entstanden 4 bis 5 Tage p.i.. Konnten dagegen auch 7 Tage p.i. keine Plaques beobachtet werden, wurde die Transfektion abgebrochen. Ein Teil der Virusüberstände wurde zur Entfernung der BAC-Sequenzen (siehe 3.4.5.1) weiter passagiert bzw. als *Backup* bei -70°C eingefroren. Das Ergebnis der jeweiligen Virus-Rekonstitutionen ist für alle Experimente in Tabelle 3.11 zusammengefasst dargestellt. Dabei fällt auf, dass die besten Transfektionsergebnisse mit 10µl bis 15µl (entspricht 1/20 bis 1/13 BAC-Maxipräparations-DNA) an transfizierter BAC-DNA erzielt wurden.

mCMV-BAC-Plasmid	Transfiziertes Volumen BAC-Plasmid-DNA [µl DNA/Well (6 Well)]				rekombinantes Virus
	5	10	15	20	
mCMV-BAC-IE1-L176A	++	+++	+++	+	mCMV-IE1-L176A
mCMV-BAC-IE1-A176L	+	+++	++++	+	mCMV-IE1-A176L
mCMV-BAC-IE1-A176L*	+	+++	+++	++	mCMV-IE1-A176L*
mCMV-BAC-IE1-A176F	+++	++++	+++	+	mCMV-IE1-A176F
mCMV-BAC-m164-I265A	+	+++	++++	+++	mCMV-m164-I265A
mCMV-BAC-m164-A265I	++	+++	+++	+	mCMV-m164-A265I
Doppelmutante	+++	++++	+++	+	Doppelmutante
Doppelrevertante	++	++++	+++	+	Doppelrevertante

Tab. 3.11 Ergebnisse zur Herstellung rekombinanter mCMV mittels BAC-Technologie. Plaque-Quantifizierung 6 Tage p.i.: + (1-5 Plaques), ++ (6-10 Plaques), +++ (11-15 Plaques), ++++ (16 ≤ x < 30 Plaques)

3.4.5.1 Exzision der BAC-Sequenzen

Nach gelungener Virusrekonstitution ist es essentiell, möglichst alle nicht-viralen-Sequenzen (bakterielle Sequenzen bzw. BAC-Vektor-Sequenz) wieder zu entfernen. Deshalb basierten die in dieser Arbeit durchgeführten homologen Rekombinationen auf dem von Wagner et al., 1999 konstruierten C3X. Zur Eliminierung aller nicht-viralen-Sequenzen wurden die bakteriellen-Sequenzen in C3X mit einer identischen viralen Sequenz-Wiederholung von 533bp d* flankiert (Wagner et al. 1999 und Abb. 3.14). Nach Transfektion von C3X in eukaryotische Zellen kommt es infolge der zellulären Rekombinationsmechanismen, für die im Gegensatz zu bakteriellen Rekombinationssysteme kürzere Sequenz-Homologien (ca. 400bp) ausreichen (Sugawara et al., 2000), zur homologen Rekombination. Dies führt zur Elimination der zwischen den duplizierten Sequenzen liegenden BAC-Vektor-Sequenzen und damit zu einem mCMV-Genom frei von bakteriellen-Sequenzen. Aufgrund der schlechteren Verpackung der viralen Überlängen-Genome werden präferenziell mCMV-Genome mit normaler Länge (frei von bakteriellen-Sequenzen) in virale Kapside verpackt und die resultierenden Viren dadurch angereichert (Wagner et al., 1999 und Abb. 3.14).

Um die von den zellulären Rekombinasen vermittelte homologe Rekombination zu ermöglichen, wurden die Virusüberstände der transfizierten Zellen 5mal wie unter 2.7.3 auf MEF passagiert. In Abb. 3.16 ist die Eliminierung der bakteriellen-Sequenzen für mCMV-IE1-L176A nach Passagierung in Zellkultur exemplarisch dargestellt.

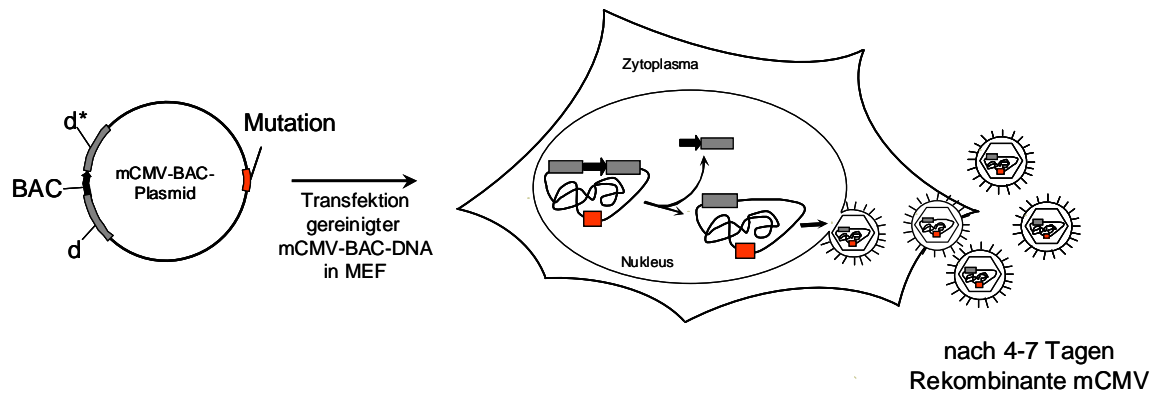


Abb. 3.14 Prinzip des Herausschneidens der bakteriellen-Sequenzen aus dem viralen-Genom durch homologe Rekombination in eukaryotischen Zellen (verändert nach Wagner et al., 1999). Nach Transfektion von mCMV-BAC-Plasmid-DNA in den Zellkern von MEF kann es dort nach 4-7 Tagen zur Rekonstitution einer Nachkommenschaft an rekombinanten Viren kommen. Das mCMV-BAC-Genom hat aufgrund der BAC-Insertion eine Überlänge und kann deshalb nur mit geringer Effizienz in Kapside verpackt werden. Das Vorhandensein von identischen viralen-Sequenzen (d und d*) ermöglicht eine homologe Rekombination zwischen diesen Sequenz-Wiederholungen und damit das Herausschneiden der dazwischen liegenden BAC-Sequenz. Dadurch werden Genome mit „normaler“ Länge, die keine bakteriellen-Sequenzen mehr besitzen, bevorzugt verpackt. Im Laufe der Virus-Passagierung kommt es somit zu einer Selektionierung von Viren ohne BAC-Sequenz.

Das Herausschneiden der BAC-Sequenzen wurde ab Virus-Passage zwei (P2) durch PCR überprüft. Hierfür wurde Virus-DNA aus separaten Klonen ab P2 aus Zellkultur isoliert. Diese DNA wurde in eine PCR (siehe 2.10.4, *Annealing*: 51°C, Zyklen: 30) mit dem Oligonukleotid-Paar *EcoRI*g und bac-b (siehe 2.8.1.2), die im mCMV-*EcoRI*-g-Fragment und im BAC-Vektor binden, eingesetzt (siehe Abb. 3.15A). Das Vorhandensein des BAC-Vektors in den Virusgenomen zeigte sich durch Amplifikation einer 1,95kbp-Bande. Konnte mit dieser PCR kein 1,95kbp Amplifikat erhalten werden, wurde mit einer zweiten PCR überprüft, ob das Herausschneiden der BAC-Sequenz korrekt erfolgt ist. Die zweite PCR (Bedingungen siehe oben) erfolgte mit den Oligonukleotiden *EcoRI*g und Flank-f (siehe 2.8.1.2). Das Oligonukleotid Flank-f bindet an die viralen-Sequenzen flankierend zum BAC-Vektor (Abb. 3.15B). Nur bei Verlust der bakteriellen-Sequenzen konnte ein 590bp Fragment amplifiziert werden. Um die Nachweissensitivität der PCR zu erhöhen, wurden die PCR-Ansätze nach Auftrennung im Agarose-Gel gebロットet und mit der Sonde p (Abb. 3.15A/B) hybridisiert. Zur Positiv- bzw. Negativkontrolle diente als *Template* CX3-Plasmid-DNA bzw. mCMV-BAC-WT-Virus-DNA.

Wie in Abb. 3.16AI zu sehen ist, konnten für die getesteten Klone von mCMV-IE1-L176A sowohl in P2 als auch in P3 und P4 (Daten nicht gezeigt) noch 1,95kbp Amplifikate und damit kontaminierende BAC-Sequenzen nachgewiesen werden. Allerdings ließen sich auch schon ab P2 590bp PCR-Fragmente detektieren. Dies besagt, dass bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt eine große Anzahl von rekombinanten Virusgenomen, mit herausgeschnittenen bakteriellen-Sequenzen, vorliegen. Nach Auftrennung der Amplifikate einer nach P5 durchgeführten PCR (Abb. 3.15BI) konnten im Agarose-Gel keine 1,95kbp Banden mehr nachgewiesen werden. Im

Unterschied zu den vorangegangenen PCRs waren dann in den analysierten Klonen ausschließlich 590bp Amplifikate nachweisbar. Auch nach Blotten des Gels und anschließender Hybridisierung mit der Sonde p (Abb. 3.16BII) konnte das zuvor im Gel beobachtete Bandenmuster bestätigt werden. Die geprüften Virusklone wurden somit als BAC-frei definiert. Mit diesem Ergebnis konnte klar gezeigt werden, dass nach fünfmaligem Passagieren rekombinante Viren angereichert wurden, die keine bakteriellen Sequenzen mehr enthielten.

Die Exzision der nicht-viralen-Sequenzen für die übrigen rekombinanten mCMV verlief analog (Daten nicht gezeigt). Schließlich wurde von allen BAC-freien Viren ein über Dichtegradienten-Ultrazentrifugation gereinigter Virusstock (siehe 2.7.1) hergestellt, welcher in *in vivo* Versuchen eingesetzt wurde. Die Titer der gereinigten und in dieser Arbeit hergestellten rekombinanten mCMV sind in Tabelle 3.12 am Ende des Kapitels aufgelistet.

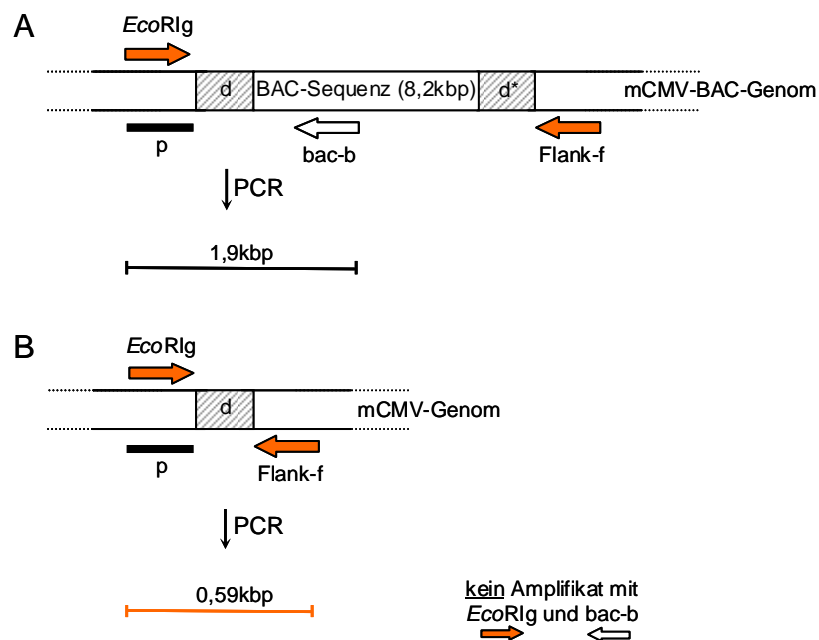


Abb. 3.15 Schematische Darstellung zum Nachweis der Eliminierung der BAC-Sequenzen aus dem Virusgenom. Schema der Genomorganisation im Bereich der BAC-Insertionsstelle vor und nach der Exzision der BAC-Sequenzen. Das Oligonukleotid *EcoRIg* bindet in dem an den BAC-Vektor angrenzenden mCMV-*EcoRI*-g-Fragment, Oligonukleotid *bac-b* bindet im BAC-Vektor. A: Nur wenn die bakterielle Sequenz noch vorhanden ist, kommt es bei der Verwendung des Oligonukleotid-Paars *EcoRIg* und *bac-b* zur Amplifikation eines 1,9kbp PCR-Produkts (schwarz). B: Bei Verwendung der Oligonukleotide *EcoRIg* und *flank-f* wird im Falle eines BAC-freien Genoms ein 590bp Fragment (rot) amplifiziert. Zum Nachweis der jeweiligen PCR-Produkte im Southern-Blot diente eine ^{32}P -markierte Sonde (p). d bzw. d* bezeichnet die flankierenden viralen Sequenz-Wiederholungen. Die Größenverhältnisse sind nicht maßstabsgetreu dargestellt.

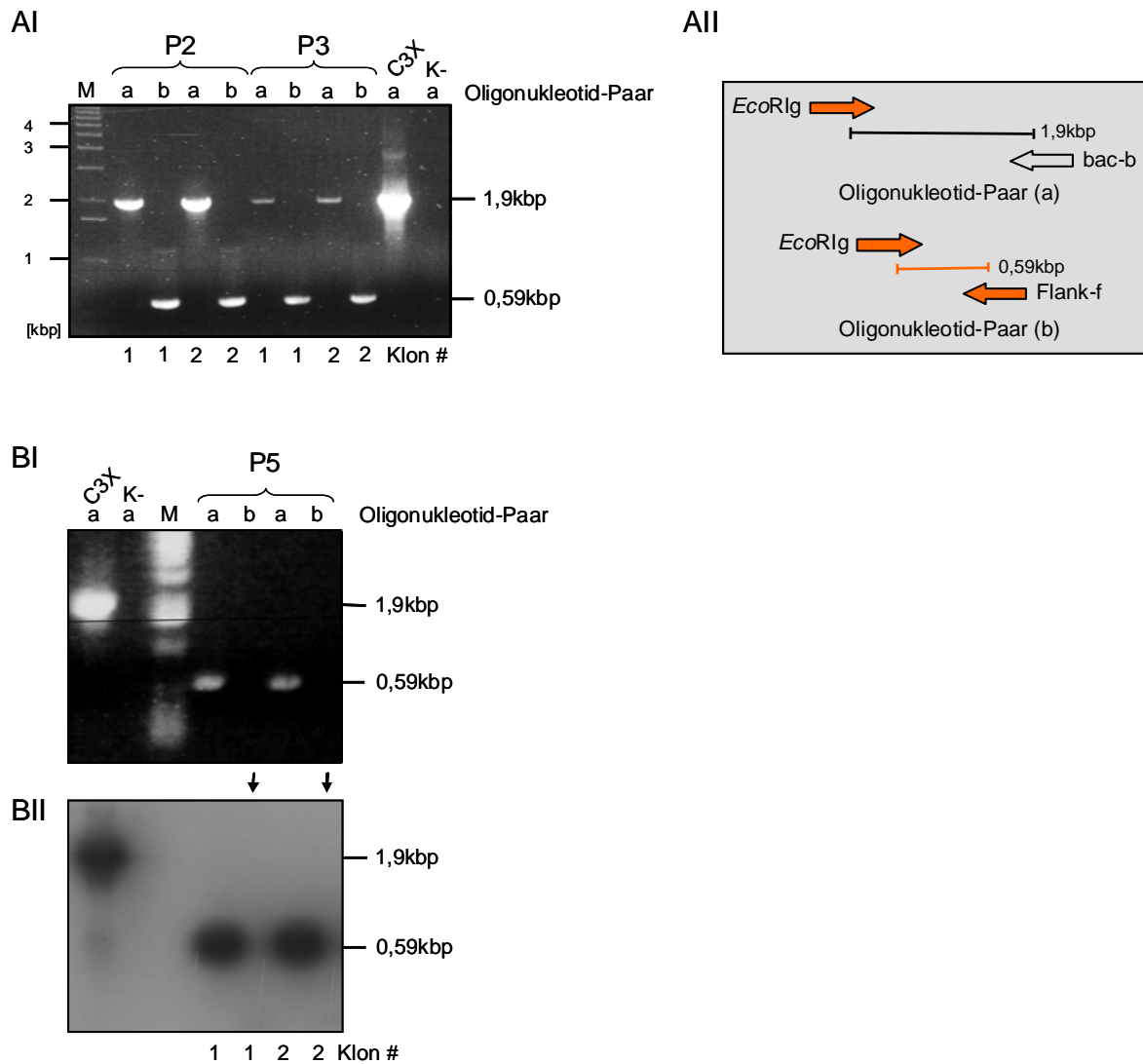


Abb. 3.16 Exzision der BAC-Sequenz aus rekombinanten Virusgenomen und Isolierung von Viren mit BAC-freien Genomen nach Virus-Passagierung in Zellkultur. Die Ergebnisse sind exemplarisch für mCMV-IE1-L176A dargestellt. Gezeigt sind mit EtBr-gefärbte 1%ige Agarose-Gele (AI, BI) sowie der korrespondierende Southern-Blot zu BI (BII). AI: Die Virus-DNA der Klone #1 und #2 wurde aus Virusüberständen der zweiten und dritten Virus-Passage (P2) und (P3) infizierter MEF isoliert, gereinigt und in je eine PCR mit dem Oligonukleotid-Paar (a) bzw. Oligonukleotid-Paar (b) eingesetzt. C3X-Plasmid-DNA: Positivkontrolle zum Nachweis bakterieller DNA-Sequenzen (BAC-Sequenz, 1,9kbp Fragment). Negativkontrolle (K-): mCMV-BAC-WT-Virus-DNA (kein 1,9kbp Amplifikat). AII: Schematische Darstellung der verwendeten Oligonukleotid-Paare sowie der Fragmentgrößen der daraus resultierenden PCR-Produkte. BI: Das EtBr-gefärbte Agarose-Gel zeigt das 0,59kbp Amplifikat (BAC-frei) aus P5 (Klon #1 und #2). BII: Zur Erhöhung der Sensitivität wurde mit der Sonde p (siehe Abb. 3.15) hybridisiert. Im Southern-Blot konnte die Abwesenheit der 1,9kbp Banden (schwarze Pfeile) bei gleichzeitigem spezifischem Nachweis der 0,59kbp Banden bestätigt werden. Damit wurden die Virusklone #1 und 2# nach P5 als BAC-frei definiert. PCR-Bedingungen siehe Text, M (1kbp Marker).

BAC-freie Virusstocks	Virustiter [PFU/ml]
mCMV-IE1-L176A	$2,3 \times 10^8$
mCMV-IE1-A176L	$2,1 \times 10^8$
mCMV-IE1-A176L*	$6,5 \times 10^8$
mCMV-IE1-A176F	$3,6 \times 10^8$
mCMV-m164-I265A	$8,7 \times 10^7$
mCMV-m164-A265I	$2,2 \times 10^8$
Doppelmutante	$4,4 \times 10^7$
Doppelrevertante	$6,2 \times 10^7$

Tab. 3.12 Virustiter der in dieser Arbeit hergestellten BAC-freien Viren. Die Virustiter wurden nach dem in Kapitel 2.6.2 beschriebenen Protokoll bestimmt.

Schlussfolgerung:

1. Nach Transfektion von rekombinanten mCMV-BAC-Plasmiden in MEF konnten erfolgreich rekombinante mCMV generiert werden.
2. Durch homologe Rekombination in den Zellen kommt es zum Herausschneiden des BAC-Vektor-Anteils aus den auf C3X beruhenden Virusgenomen. Eine wiederholte Passagierung einzelner Virusklone führte somit zur Anreicherung von BAC-freien Viren.

3.5 Etablierung einer quantitativen *Real-Time-PCR* zur viralen DNA-Bestimmung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals eine mCMV-spezifische quantitative *Real-Time-PCR* (qPCR) entwickelt, mit der es möglich war, die Anzahl an viralen Genomen pro Zelle zu bestimmen.

3.5.1 Konstruktion eines Plasmid-Standards

Eine wichtige Voraussetzung für die Etablierung der qPCR bestand in der Bereitstellung eines geeigneten Plasmid-Standards. Die Klonierung des Standard-Plasmids pDrive_gB_PTHrP_Tdy, welches Sequenzen von mCMV *M55/gB* sowie Sequenzen des zellulären Gens *pthrp* (*murine parathyroid hormone-related peptide-encoding gene*) (Mangin et al., 1990) und *tdy* (*male sex*

[*testes*]-determining gene) (Gubbay et al., 1990) beinhaltet, ist im folgendem detailliert beschrieben.

Zuerst wurde das Zwischenkonstrukt1 Plasmid pDrive_gB generiert. Hierzu wurde in einer PCR (siehe 2.10.4.1) mit dem Oligonukleotid-Paar gB-for und gB-rev (siehe 2.8.1.2, *Annealing*: 55°C) ein Fragment des gB-Gens aus mCMV-Virion-DNA amplifiziert. Das 2817bp Amplifikations-Produkt, welches die mCMV-gB-Sequenz von Nukleotidposition 82.910n bis 85.726n (*GenBank accession no.* NC_004065 [komplettes Genom]) (Rawlinson et al., 1996) beinhaltet, konnte mittels UA-basierter Ligation (siehe 2.9.10.1) in pDrive kloniert werden.

Plasmid pDrive_gB_PTHrP wurde als Zwischenkonstrukt2 hergestellt. Hierzu musste ein 984bp gB-Fragment durch Restriktion mit *Apal* und *Xbal* aus pDrive_gB deletiert werden. Die Oligonukleotide *Apal*-PTHrP-7neu (siehe 2.8.1.2, mit *Apal* Schnittstelle, *Annealing*: 55°C) und *Xbal*-rcPTHrP-8neu (siehe 2.8.1.2, mit *Xbal* Schnittstelle) dienten zur Amplifikation eines 238bp *pthrp*-Fragments, wobei als *Template* isolierte Mausschwanz-DNA diente. Ein 258bp großes Amplifikations-Produkt, welches die 238bp *pthrp*-Sequenz von Nukleotid Position 126n bis 363n (*GenBank accession no.* M60056) enthielt, wurde nach Restriktion mit *Apal* und *Xbal* in den mit *Apal* und *Xbal* geöffneten pDrive_gB eingesetzt.

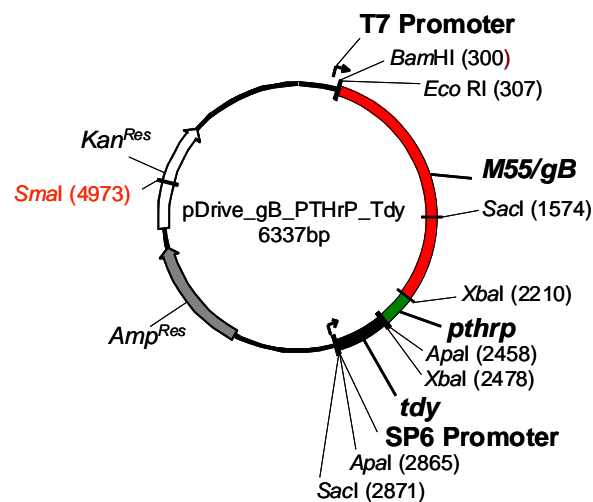


Abb. 3.17 Plasmidkarte von pDrive_gB_PTHrP_Tdy. Physikalische Karte des klonierten Plasmids pDrive_gB_PTHrP_Tdy, das als Standard-Plasmid zur Quantifizierung der viralen DNA-Load mittels qPCR eingesetzt wurde. Es umfasst das mCMV-Gen *M55/gB* (rot) sowie das zelluläre Gen *pthrp* (*murine parathyroid hormone-related peptide-encoding gene*, grün) und *tdy* (*male sex [testes]-determining gene*, schwarz). *Smal*-single cut, rot.

Die finale Konstruktion von pDrive_gB_PTHrP_Tdy erfolgte nach Linearisierung von pDrive_gB_PTHrP mit *Apal*. Danach konnte ein 407bp PCR-Fragment, das die 401bp *tdy*-Sequenz von Nukleotidposition 70n bis 471n (*GenBank accession no.* 287804) umfasst, in das mit *Apal* gespaltene Plasmid pDrive_gB_PTHrP ligiert werden. Das PCR-Fragment wurde zuvor mit dem Oligonukleotid-Paar TdyGene_for1 und TdyGene_rev1 (siehe 2.8.1.2, mit *Apal* Schnittstelle, *Annealing*: 60°C) generiert. Es sollte an dieser Stelle erwähnt werden, dass in der vorliegenden

Arbeit das *tdy*-Gen keine Verwendung fand. Es wurde aber in die Konstruktion des Standard-Plasmids mit einbezogen, damit es in zukünftigen Studien möglich ist, zwischen Donor- und Rezipienten-abgeleiteten Zellen bei mCMV-Infektion in nicht gleichgeschlechtlichen KMT Modellen zu unterscheiden.

Für die Verwendung als Standard-Plasmid in einer qPCR wurde pDrive_gB_PTHrP_Tdy mit *Sma*I linearisiert und anschließend mittels *High Pure PCR Purification* Kit der Firma Roche (siehe 2.9.7) gereinigt. Eine Plasmidkarte von pDrive_gB_PTHrP_Tdy mit den klonierungsrelevanten Restriktionsschnittstellen zeigt Abb. 3.17.

3.5.2 qPCR zur absoluten Quantifizierung viraler DNA.

Nachdem der Plasmid-Standard pDrive_gB_PTHrP_Tdy erfolgreich kloniert wurde, konnte im Anschluss daran die Etablierung der qPCR erfolgen. Die Etablierung erfolgte mit einem *TaqMan* (ABI PRISM® 7700) unter der Verwendung des *QuantiTect SYBR Green PCR Kits* (QIAGEN).

Im Speziellen sollte die qPCR zum Nachweis des viralen Gens *M55/gB* und zellulären Gens *pthrp* eingesetzt werden.

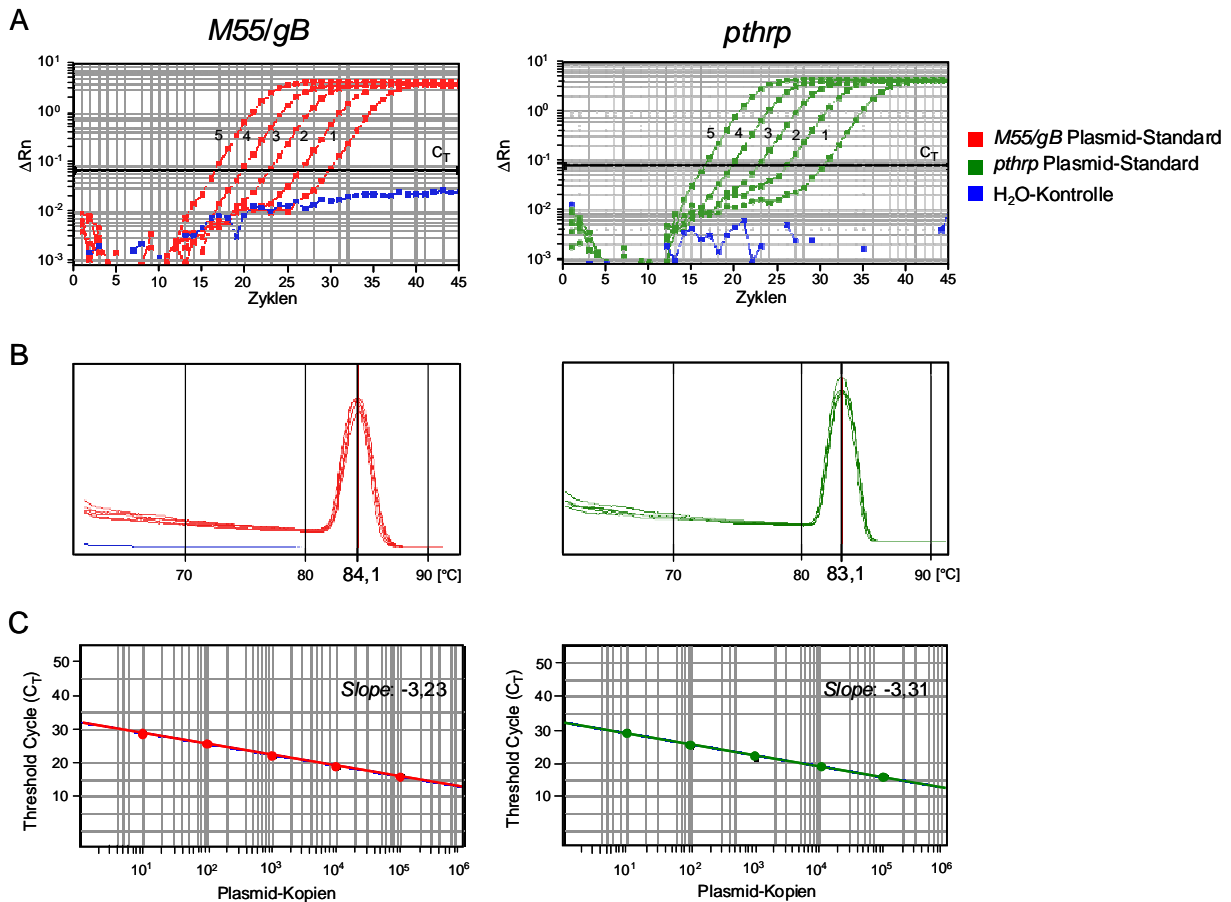
Geeignete Oligonukleotid-Paare sowie optimale *Annealing*-Temperaturen mussten empirisch ermittelt werden. Die Auswahl potentieller Oligonukleotide erfolgte mit Hilfe des Programms *Primer-Express* (siehe 2.10.4.4.1). Für die Optimierungsexperimente wurden \log_{10} -Titrationen des mit *Sma*I linearisierten Plasmids pDrive_gB_PTHrP_Tdy als Matrizen-DNA verwendet. Die optimale Amplifikatlänge für eine *Real-Time-PCR* liegt zwischen 100 und 150 Basenpaaren. Kürzere PCR-Fragmente amplifizieren effizienter als längere und sind gleichzeitig toleranter gegenüber sich verändernden Reaktionsbedingungen.

Als optimal wurden Reaktionsbedingungen bewertet, die im *TaqMan* Amplifikations-Profil parallel ansteigende Amplifikationskurven sowie im Schmelzdiagramm ausschließlich die entsprechenden Schmelzpunkte der spezifischen *M55/gB* bzw. *pthrp* Amplifikate zeigten. Außerdem mussten Amplifikations-Effizienzen von annähernd 100% erreicht werden.

Die besten Ergebnisse für *M55/gB* wurden mit dem Oligonukleotid-Paar LCgB_For3/LCgB_Rev3 und für *pthrp* mit LCPTHrP_1/LCPTHrP_2 (Oligonukleotide siehe 2.8.2.1), bei einer *Annealing*-Temperatur von 62°C erzielt. Das optimierte *TaqMan* PCR-Profil sowie technische Details können Kapitel 2.10.4.4.1 entnommen werden.

In Abb. 3.18A ist ein optimiertes *TaqMan* Amplifikations-Profil für 10^5 bis 10^1 Kopien des linearisierten Plasmid-Standards pDrive_gB_PTHrP_Tdy gezeigt. Die daraus resultierenden Schmelzkurven der amplifizierten 135bp ($T_M = 84,1^\circ\text{C}$) *M55/gB*- bzw. 142bp ($T_M = 83,1^\circ\text{C}$) *pthrp*-Amplikons sind in Abb. 3.19B dargestellt. Die Ergebnisse lassen deutlich erkennen, dass die entstandenen Amplifikate jeweils nur ein Maximum, welches dem jeweiligen T_M -Wert des spezifischen Amplikons entspricht, aufweisen. Damit konnten Nukleotid-Dimere oder andere

unspezifische PCR-Amplifikate, die sich negativ auf die PCR-Amplifikations-Effizienz auswirken könnten, eindeutig ausgeschlossen werden.



3.18 Ermittlung optimaler qPCR Bedingungen. A: *TaqMan* Amplifikations-Profil für 10^1 bis 10^5 Kopien (markiert durch die Exponenten 1-5) des mit *Sma*I linearisierten Standard-Plasmids pDrive_gB_PTHrP_Tdy. Eine Kontrolle, die alle Reaktionskomponenten außer Matrizen-DNA enthält, ist in blau dargestellt (H₂O-Kontrolle). PCR-Bedingungen siehe Text. Die schwarze, horizontale Linie kennzeichnet den Schwellenwert (*Threshold*), der zu Bestimmung des C_T-Wertes dient. Der C_T-Wert bezeichnet den PCR-Zyklus, bei dem die Amplifikationskurve den Schwellenwert übersteigt. B: Schmelzdiagramme der spezifischen *M55/gB* bzw. *pthrp* Amplikons. C: Die Auftragung der jeweiligen C_T-Werte gegen die korrespondierende Kopienzahl des Plasmid-Standards führt zu den entsprechenden *M55/gB* bzw. *pthrp* Standardkurven (Details siehe Text).

Die Berechnung der PCR-Amplifikations-Effizienz (E) für *M55/gB* und *pthrp* erfolgte mit der Formel $E = [10^{(-1/\text{slope})}] - 1$ (QIAGEN, *Critical Factors for Successful Realtime PCR* 01/2004). Diese wurde für beide Gene sowohl für die Standardkurven (Abb. 3.18C) als auch in einer Titration mit gereinigter Proben DNA (Daten nicht gezeigt) berechnet. Alle berechneten PCR-Amplifikations-Effizienzen lagen bei annähernd 100%. Damit konnte in jedem PCR Zyklus eine Verdopplung der Amplifikate erzielt werden. Um zu testen, ob die *M55/gB*-PCR mit der *pthrp*-PCR vergleichbar ist, wurden die ΔC_T -Werte der beiden Einzel-PCRs gegen den Logarithmus der Plasmid- bzw. Probenmenge aufgetragen. Ergibt sich daraus eine Gerade mit der Steigung $\leq 0,1$ (QIAGEN, *Critical Factors for Successful Realtime PCR* 01/2004), so liegen identische Amplifikations-Effizienzen vor und die beiden PCRs sind miteinander vergleichbar. Wie aus Abb. 3.19 klar zu erkennen ist, konnte diese

Bedingung für die Standardkurven von *M55/gB* und *pthrp* erfüllt werden. Ebenso ergab der Vergleich der PCR-Amplifikations-Effizienzen für jedes der zwei Gene, zwischen titrierter Proben-DNA und der jeweiligen Standardkurve, eine Gerade mit der Steigung $\leq 0,1$ (Daten nicht gezeigt). Damit konnte eindeutig bewiesen werden, dass beide PCRs (*M55/gB* und *pthrp*) mit vergleichbaren Effizienzen unter optimalen Bedingungen erfolgen.

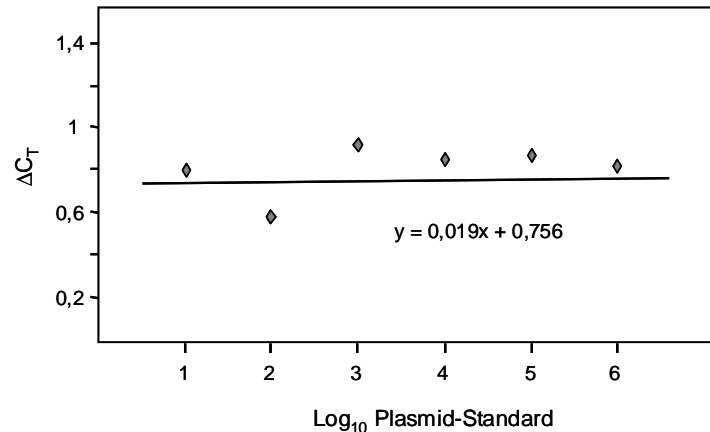


Abb. 3.19 Vergleichbarkeit der PCR-Amplifikations-Effizienz. Y-Achse: ΔC_T (C_T *M55/gB* - C_T *pthrp*), X-Achse: Log der Plasmid Konzentration. Erklärungen siehe Text.

Bemerkung: Analog zu der beschriebenen *TaqMan* qPCR kann diese auch an einem *Light Cycler* durchgeführt werden. Das entsprechende *Light Cycler* PCR-Profil ist im Anhang 6.5 beschrieben.

Schlussfolgerung:

1. Mit der erfolgreichen Klonierung des Plasmid-Standards pDrive_gB_PTHrP_Tdy wurde die experimentelle Voraussetzung zur Etablierung einer qPCR geschaffen, die eine absolute Quantifizierung viraler DNA ermöglicht.
2. Es konnte eine spezifische qPCR zum Nachweis des mCMV Gens *M55/gB* sowie des zellulären Gens *pthrp* etabliert werden. Dabei wurde eine Nachweissensitivität von mindestens 10 Kopien des Plasmid-Standards pDrive_gB_PTHrP_Tdy erreicht.

3.6 Bestimmung des Genom-zu-PFU-Verhältnisses

Zur Evaluierung der Anzahl viraler Genome, welche zur Bildung eines Plaques auf MEF benötigt werden und somit einem PFU entsprechen, wurde das Genom-zu-PFU-Verhältnis bestimmt. Dies spiegelt die Anzahl viraler Genome wider, welche zur Initiation des zytolytischen Plaque-bildenden produktiven Zyklus benötigt werden. Da die Plaque-Bildung über 3-5 Tage die Ausbreitung der Infektion in Zellkultur einschließt, beinhaltet das Genom-zu-PFU-Verhältnis zudem die virale Infektiosität über mehrere Replikationsrunden hinweg. Wie von Kurz et al. (1997) beschrieben,

beträgt das Genom-zu-PFU-Verhältnis des Referenzstammes mCMV Smith (WT-mCMV) ~ 500 zu 1.

Im Vergleich zu WT-mCMV und mCMV-BAC-WT zeigten die rekombinanten Viren mCMV-IE-L176A, mCMV-IE1-A176L, mCMV-IE1-A176L* und mCMV-IE1A176F keinerlei Beeinträchtigung der Vermehrung in MEF. Sowohl Plaquegröße (Daten nicht gezeigt), als auch Virustiter (siehe Tabelle 3.12) waren vergleichbar.

Dennoch wurde zur exakten Quantifizierung der Genom-zu-PFU-Verhältnisse die einer definierten PFU-Zahl (siehe Tabelle 6.5; 6.6 im Anhang 6) entsprechende, gereinigte (siehe 2.10.3.2) Virus-DNA der oben aufgeführten Viren in \log_{10} -Stufen (über 5 Verdünnungs-Stufen) titriert. Die Ausbeute der einzelnen Virus-DNA-Isolierungen unterliegt, wie jede DNA-Präparation, einer statistischen Schwankung. Deshalb wurde die jeweilige Virion-DNA in voneinander unabhängigen Triplikaten aufgereinigt. Die Anzahl an viralen Genomen wurde anschließend für jede Titrationsreihe und Verdünnungs-Stufe über eine *M55/gB*-spezifische qPCR (Oligonukleotid-Paar: LCgB_For3/LCgB_Rev3; PCR-Profil siehe 2.10.4.4.1) bestimmt. Dabei diente das linearisierte Plasmid pDrive_gB_PTHrP_Tdy als Standard. Das Ergebnis der Evaluierung der *in vitro*-Infektiosität für die getesteten Viren ist in Abb. 3.20 dargestellt.

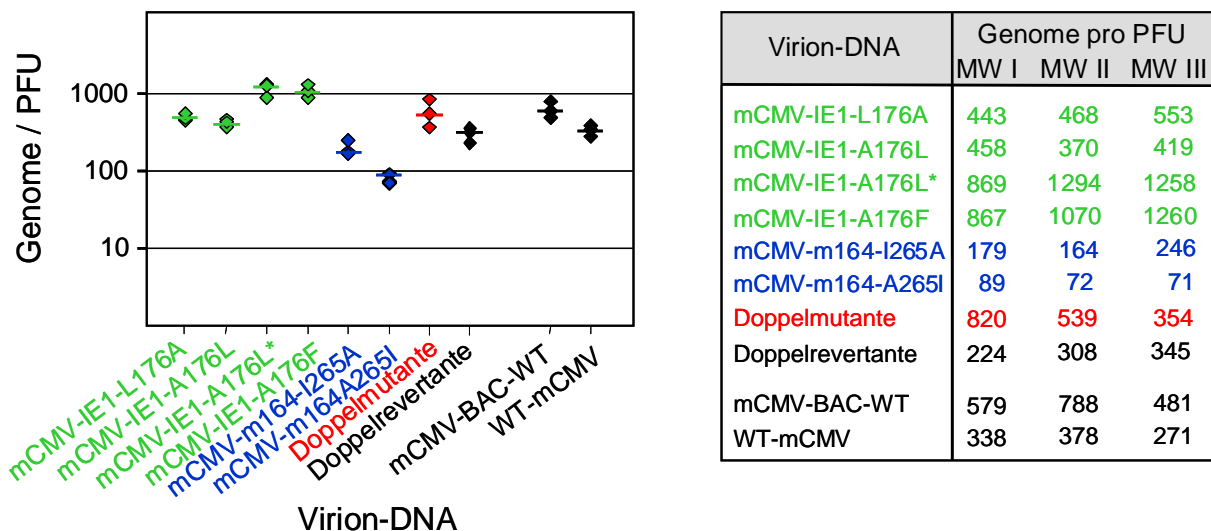


Abb. 3.20 *In vitro*-Infektiosität der mCMV-Rekombinanten im Vergleich zu mCMV-BAC-WT und WT-mCMV. Die einer definierten PFU-Zahl entsprechende Virion-DNA wurde in voneinander unabhängigen Triplikaten aufgereinigt, jeweils titriert (5 \log_{10} -Stufen) und in eine *M55/gB*-spezifische qPCR eingesetzt. Dabei diente Plasmid pDrive_gB_PTHrP_Tdy als Standard. Links: Grafische Darstellung der Genom-zu-PFU-Verhältnisse der hergestellten mCMV-Rekombinanten im Vergleich zu mCMV-BAC-WT und WT-mCMV. Die Medianwerte sind durch einen horizontalen Strich gekennzeichnet. Rechts: Berechnete Mittelwerte (MW, aus 3 x 5 Werten) der viralen Genome pro PFU, die sich aus dem für jede Verdünnungsstufe einer Titrationsreihe ermittelten Genom-zu-PFU-Verhältnis zusammensetzen.

Die Analyse ergab, dass die ermittelten Genom-zu-PFU-Verhältnisse der untersuchten Viren sehr gut in dem für WT-mCMV erwarteten Bereich von 500 Genomen pro einem PFU lagen. Auch wenn das bereits von unserer Arbeitsgruppe veröffentlichte Genom-zu-PFU-Verhältnis (Kurz et al., 1997)

von ~500:1 für WT-mCMV nicht exakt bestätigt werden konnte, ist die Abweichung bemerkenswert gering zumal der publizierte Wert ebenfalls mit einem Fehler (DNA-Präparation, photometrische DNA-Mengen Bestimmung, statistischer Fehler der PFU Bestimmung etc.) behaftet war. Zudem war es unserer Arbeitsgruppe damals noch nicht möglich, die Analyse mit einem modernen und sensitiven Verfahren wie der *qPCR* durchzuführen. Deshalb ist es umso beeindruckender, dass der damals ermittelte Wert von ~500 Genomen pro PFU auch durch *qPCR* im Mittel bestätigt werden konnte. Die geringfügigen Abweichungen der berechneten Genom-zu-PFU-Verhältnisse für die generierten Rekombinanten sowie für mCMV-BAC-WT im Vergleich zu WT-mCMV sind somit nicht ungewöhnlich, sondern in erster Linie auf statistische Schwankungen bei der DNA-Isolierung zurückzuführen. Die Ergebnisse der Genom-zu-PFU-Bestimmungen zeigen, dass die durch BAC-Mutagenese inserierten Punktmutationen die *in vitro*-Infektiosität der Rekombinanten nicht oder nur minimal beeinflussen. Ob die leicht erhöhten Genom-zu-PFU-Verhältnisse für mCMV-IE1-A176L* und mCMV-IE1-A176F auf die jeweiligen Punktmutationen zurückzuführen sind oder auf anderen Ursachen basieren, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden.

Schlussfolgerung: Die *in vitro*-Infektiosität der mCMV-Rekombinanten mit Punktmutationen im MHC-Anker Codon des IE1- und/oder des m164-Peptids wurde nicht wesentlich verändert.

3.7 Überprüfung der Funktionalität mutierter IE1-Proteine

Die Mutationen von MHC-Ankeraminosäuren wie L→A oder I→A verkürzen nur die hydrophobe Seitenkette, die das Peptid in der hydrophoben Bindungstasche des MHC-Moleküls verankert. Dies ist eine für das Erzielen des gewünschten immunologischen Phänotyps notwendige, dabei aber weitgehend für das Protein strukturkonservative Veränderung. Dennoch war ein Einfluss auf die Proteinfunktion nicht von vornherein auszuschließen. Das IE1-Protein ist zwar nicht essentiell für Replikation in Zellkultur, ist aber wesentlich für effiziente *in vivo*-Replikation in ruhenden Zellen und damit für die *in vivo*-Virulenz (Ghazal et al., 2005). Dies beruht auf der Fähigkeit des IE1-Proteins, zelluläre Gene des Nukleotidmetabolismus, wie z. B. das Thymidylat Synthase (TS) Gen (Gribaudo et al., 2000) und das Ribonukleotid-Reduktase (RNR) Gen (Lembo et al., 2000) zu transaktivieren. Diese Funktionen des IE1-Proteins sind testbar, indem die Funktionalität der mutierten IE1-Proteine als Transaktivatoren in einem Dual-Luciferase Reportergen (DLR)-Assay (siehe 2.4.5; Prinzip Abb. 3.22A) geprüft wird.

Die Punktmutationen im Codon der C-terminalen MHC-Klasse-I-Ankeraminosäure wurden aus den entsprechenden IE1-*Shuttle*-Plasmiden (pST76K_IE1Ala, pST76K_IE1Leu* und pST76K_IE1Phe) nach Restriktion mit den Enzymen *Xba*I und *Eco*47III sowie *Bsm*I in das mit *Xba*I und *Eco*47III geöffnete IE1-Expressionsplasmid pIE100/1 (Messerle et al., 1992) subkloniert (siehe Abb. 3.21). Dabei diente *Bsm*I zur Trennung der durch *Xba*I und *Eco*47III-Verdau entstandenen Doppelbande,

in dem das MIEPE enthaltene 1,8kbp Fragment in zwei 0,5kbp und 1,3kbp Fragmente gespalten wurde (siehe Abb. 3.21). Die aus der Subklonierung resultierenden Plasmide pIE1-L176A und pIE1-A176F wurden mit der Bezeichnung pIE1-Mut zusammengefasst benannt.

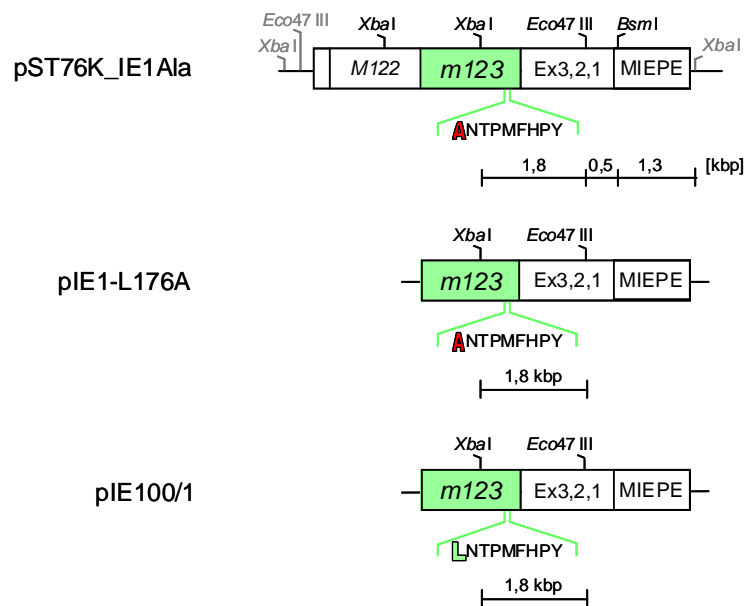


Abb. 3.21 Klonierungsstrategie zur Herstellung der IE1-Expressionsplasmide. Die Klonierung ist exemplarisch für die Herstellung von pIE1-L176A dargestellt. Das *Shuttle*-Plasmid pST76K_IE1Ala wurde mit den Restriktionsenzymen *Xba*I, *Eco*47III und *Bsm*I geschnitten. Das 1,8kbp Fragment, welches die Punktmutation L176A im IE1-Peptid enthält, wurde dann in das mit *Xba*I und *Eco*47III geschnittene IE1-Expressionsplasmid pIE100/1 subkloniert und somit das rekombinante Expressionsplasmid pIE1-L176A erhalten. Die C-terminalen MHC-Klasse-I-Ankeramino-säuren X (WT-Aminosäure, grün; Mutation, rot) des IE1-Peptids sind hervorgehoben: pST76K_IE1Ala (A[GCA]), pIE1-L176A (A[GCA]) und pIE100/1 L[CTA]). Die für Klonierungsschritte verwendeten Restriktionsschnittstellen sind eingezeichnet. Restriktionsschnittstellen im Vektor pST76K_IE1Ala sind grau dargestellt.

Die für den Reporter-gen Assay zusätzlich benötigten Firefly Luciferase Reporterplasmide pTLG (TS) und pGL3R2 1.5 (RNR) wurden von Prof. Landolfo, Turin/Italien, und Prof. Thelander, Umea/Schweden, zur Verfügung gestellt. Als Kontrolle für die basale TS und RNR Promotoraktivität diente pUC19, als Positiv-Kontrolle für die Transaktivierung durch IE1 diente pIE100/1. Die Transfektionseffizienz wurde mit pRL-TK (HSV-TK Promotor vor Renilla Luciferase) kontrolliert. Die mit dem (DLR)-Assay-System durchgeführten Transfektionsexperimente in ruhenden NIH 3T3 wurden erfolgreich durchgeführt und ergaben keinen negativen Einfluss der Mutationen IE1-L176A und IE1L176F auf die Transaktivator-Funktion des IE1-Proteins für die Expression von TS oder RNR (siehe Abb. 3.22 B). Allerdings konnte mit dem Plasmid pIE1-A176L* keine Transaktivator-Funktion des IE1-Proteins auf die untersuchten Promotoren nachgewiesen werden. Dies war im höchsten Maße unerwartet, weil das von pIE1-A176L* exprimierte IE1-Protein exakt dem IE1-WT-Protein entsprechen sollte und im Gegensatz zu pIE1-Mut keine geplante Mutation in der Aminosäuresequenz aufweist. Tatsächlich zeigte ein Sequenzvergleich zwischen IE1-A176L* und der WT-IE1-Sequenz *upstream* der DNA-Sequenz des IE1-A176L*-Peptids bei Nukleotidposition 181.045 eine nicht intendierte Punktmutation TAT→TGT. Diese Mutation führt

gleichzeitig zu einer Veränderung der entsprechenden Aminosäure Y165C im resultierenden IE1-A176L*-Protein und könnte somit für den Ausfall der Transaktivator-Funktion verantwortlich sein.

Bemerkung: Vergleichbare Funktionskontrollen waren für die m164-Mutanten nicht möglich, da über mögliche Funktionen des ORFm164 Proteins z. Z. nichts bekannt ist.

Schlussfolgerung: Das Ergebnis des DLR-Assays zeigt deutlich, dass die generierten Mutationen in der MHC-Ankeramino-säure des IE1-Peptids L176A und A176F keinen negativen Einfluss auf die Transaktivator-Funktion des IE1-Proteins für die Expression von TS und RNR besitzen.

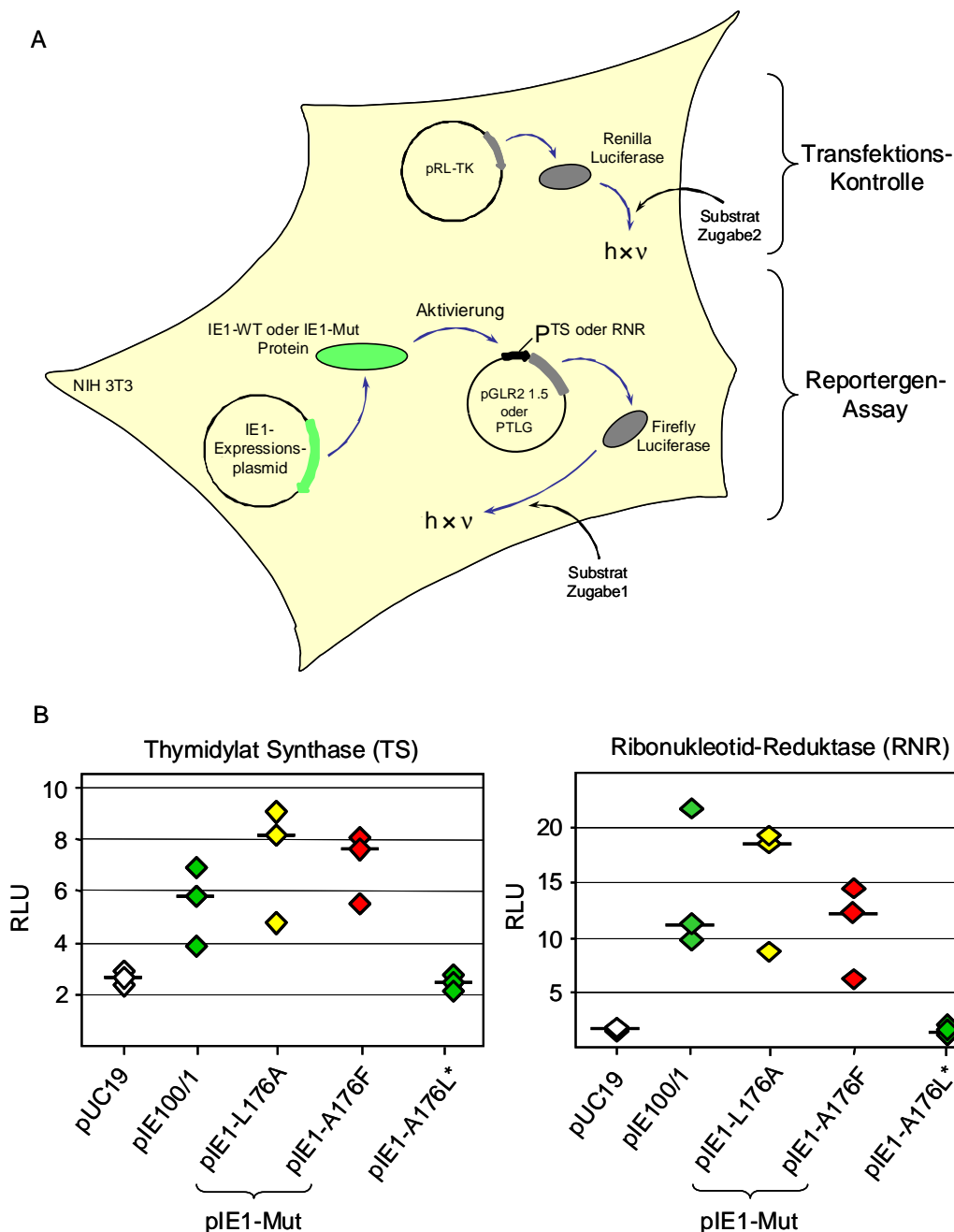


Abb. 3.22 Prüfung der Funktionalität mutierter IE1-Proteine im Dual-Luciferase Reporter Assay. A, Prinzip: NIH 3T3 Zellen wurden in Triplikaten mit dem Renilla Luciferase Expressionsplasmid pRL-TK

(Transfektions-Kontrolle), dem jeweiligen *Firefly* Luciferase Reporterplasmid pTLG (Thymidylat Synthase) oder pGL3R2 1.5 (Ribonukleotid-Reduktase), sowie dem IE1-Expressionsplasmid (pIE100/1, pIE1Mut oder pIE1-A176L*) oder pUC19 als Negativ-Kontrolle transfiziert. Zur Testung der Transaktivator-Funktion mutierter IE1-Proteine für die Expression von TS oder RNR in ruhenden Zellen wurden die transfizierten Zellen einen Tag nach der Transfektion für exakt 48h in *Starving*-Medium [DMEM + 0,5% (v/v) NCS] inkubiert und dadurch in der G0/G1 Phase arretiert. Danach wurden die Zellen lysiert und dann sowohl die Expression des Reportergens (*Firefly* Luciferase) als auch die Expression der Transfektions-Kontrolle (*Renilla* Luciferase) quantifiziert. P, Promotor. B: Die Daten wurden durch Bildung des Quotienten *Firefly* Luciferase (RLU^F)/*Renilla* Luciferase (RLU^{RL}) auf die Transfektionseffizienz normiert. Alle Messungen erfolgten in Triplikaten (mit von einander unabhängig co-transfizierten Zellen). Medianwerte sind durch schwarze horizontale Balken gekennzeichnet.

3.8 *In vivo* Charakterisierung von mCMV-Rekombinanten

Auf der Basis der bisherigen Daten konnte davon ausgegangen werden, dass die *in vitro*-Infektiosität der mCMV-IE1-Mutanten sowie die Funktionalität des IE1-Proteins durch Mutation der MHC-Ankeraminosäure des IE1-Peptids, bis auf die Rekombinante mCMV-IE1-A176L*, nicht beeinträchtigt worden war. Dies war eine Grundvoraussetzung zur *in vivo*-Untersuchung der generierten Rekombinanten.

Im murinen Modellsystem sollte nun die Frage geklärt werden, ob die generierten Rekombinanten mCMV-IE1-L176A (I), mCMV-IE1-A176L (II), mCMV-IE1-A176L* (III) und mCMV-IE1-A176F (IV) (I bis IV) *in vivo* im Vergleich zu mCMV-BAC-WT(V) nach Infektion immunsupprimierter Mäuse prinzipiell mit vergleichbarer Effizienz replizieren und die Replikation der Rekombinanten in für die CMV-Erkrankung repräsentativen Organen (Leber und Milz) stattfindet.

3.8.1 Quantitative Analyse der Virus-Replikation

Um aussagekräftige *in vivo* Versuche durchführen zu können, muss ein rekombinantes mCMV-BAC-Genom nach Passagierung in *E. coli* wieder Virus rekonstituieren können, welches nach Infektion der Maus eine dem mCMV-BAC-WT vergleichbare Replikation, Organverteilung, und Pathogenität zeigt.

Eine exakte quantitative Analyse sollte Anzeichen auf eine eventuelle Attenuierung oder auch Virulenz-Erhöhung der hergestellten Virus-Rekombinanten hinsichtlich ihrer *in vivo*-Replikation in unterschiedlichen Organen aufzeigen.

Um einen unerwarteten und unbeabsichtigten nicht-immunologisch bedingten Phänotyp der Mutanten auszuschließen mussten die Versuche in immundepletierten Tieren durchgeführt werden. Dazu wurden 8 Wochen alte Rezipienten (weibliche BALB/c Mäuse) durch 7Gy γ -Bestrahlung (siehe 2.6.2) immundepletiert, anschließend randomisiert und in 5 Gruppen (I bis V) aufgeteilt. Danach wurden alle Gruppen mit jeweils einer Virus-Rekombinante (I bis IV) oder mCMV-BAC-WT (V) intraplantar mit 2×10^5 PFU (siehe Abb. 3.23) infiziert.

Eine allgemein bekannte und akzeptierte Tatsache ist, dass der Virustiter individueller Tiere erheblichen Schwankungen unterliegt, selbst wenn es sich um Inzuchttiere gleichen Alters und gleichen Geschlechtes handelt und weitere Versuchparameter konstant gehalten werden. Speziell nach hämatoablativer Behandlung der Tiere durch γ -Bestrahlung variieren die Organtiter, insbesondere in der Leber, um einen Faktor 10 bis 100 (Reddehase et al., 1985). Der durch die Bestrahlung ausgelöste genotoxische Effekt unterliegt einem statistischen Ereignis, womit Immunfunktionen in unterschiedlicher Weise betroffen werden und somit das Phänomen der auftretenden Titer-Varianzen erklärbar ist. Eine Beurteilung der *in vivo*-Infektiosität mehrerer Viren durch Vergleich einzeln-infizierter Experimentalgruppen wird dadurch deutlich erschwert. Eine statistische Auswertung ist deshalb unabdingbar. Deshalb erfolgte die Analyse der Mäuse in Form von Triplikaten, um sowohl die Replikations-Varianz in den Organen eines Individuums als auch zwischen den Individuen zu erfassen. Das experimentelle Protokoll der Tierversuchsdurchführung ist in Abb. 3.23 dargestellt.

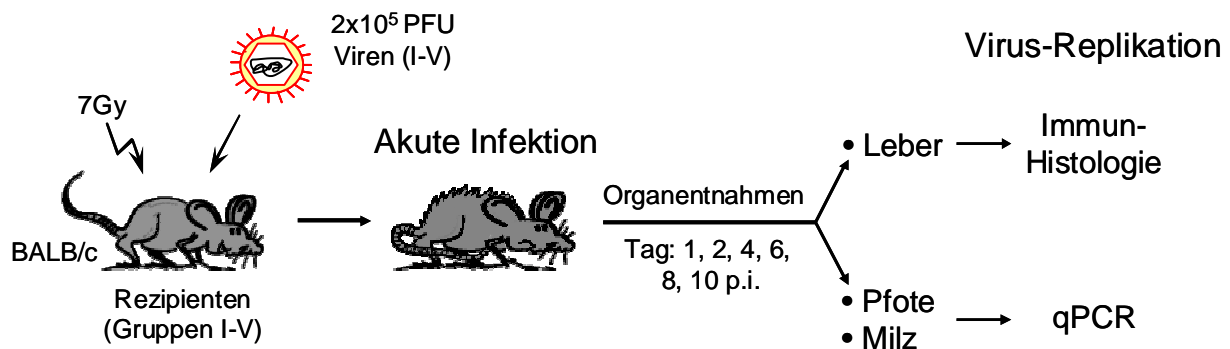


Abb. 3.23 Modell zur Untersuchung der *in vivo*-Replikation der mCMV-IE1-Mutanten. Zur Untersuchung der *in vivo*-Replikation der rekombinanten Viren mCMV-IE1-L176A (I), mCMV-IE1-A176L (II), mCMV-IE1-A176L* (III) sowie mCMV-IE1-A176F (IV) im Vergleich zu mCMV-BAC-WT (V) wurden weibliche BALB/c Mäuse durch 7Gy γ -Bestrahlung immunodepletiert, anschließend randomisiert und in 5 Gruppen aufgeteilt. Danach wurden die Gruppen mit der entsprechenden Rekombinanten oder mit mCMV-BAC-WT intraplantar infiziert. Die Kinetik der Virus-Replikation wurde sowohl durch IE1-spezifische Immunhistologie in der Leber als auch durch qPCR mit DNA-Isolaten aus Milz und Pfote verfolgt.

Wie bereits von Podlech et al. (1998) gezeigt, gehört mCMV zu den polytropen Viren, welche verschiedene Zelltypen produktiv infizieren können. Bei Abwesenheit von schützenden CD8 T-Zellen resultiert daraus eine Multi-Organerkrankung. In der vorliegenden Arbeit musste aus Zeitgründen auf eine Überprüfung aller erkrankten Organe verzichtet werden. Stattdessen wurde die Analyse der Virus-Replikation, stellvertretend für alle infizierbaren Organe, in Leber und Milz durchgeführt. Da die Infektion der Tiere intraplantar erfolgte, wurde die Virus-Replikation zusätzlich am unmittelbaren Infektionsort, also in der Pfote, verfolgt.

Die Untersuchung der Virus-Replikation erfolgte mit zwei von einander unabhängigen Methoden. Für Milz und Pfote wurde die Virus-Replikation durch qPCR (siehe 3.8.1.1) in der Leber hingegen durch IE1-spezifische Immunhistochemie (IHC, siehe 3.8.1.2) untersucht.

3.8.1.1 Quantifizierung der *in vivo*-Replikation mittels qPCR

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte mCMV-spezifische qPCR zum Nachweis des viralen Gens *M55/gB* sowie des zellulären Gens *pthrp* diente neben der Bestimmung des Genom-zu-PFU-Verhältnisses insbesondere zur Quantifizierung der *in vivo*-Replikation.

Hierzu wurde die DNA von je drei Tieren der jeweiligen Versuchsgruppe (I bis V, siehe Abb. 3.23) an den Tagen 2, 4, 6, 8 und 10 p.i. unabhängig voneinander aus Pfote und Milz isoliert (siehe 2.10.3.1). Um Varianzen in der viralen-Load-Bestimmung (Einzeltierschwankung und Varianz der DNA-Reinigung) zu erfassen wurde die gereinigte DNA für jedes Tier in voneinander unabhängigen Verdünnungen getestet. Die Anzahl an viralen Genomen wurde anschließend über eine *M55/gB*-spezifische qPCR bestimmt und vermittels einer *pthrp*-spezifischen qPCR (siehe 3.5.2) auf die Zahl der Zellen normiert. In Abb. 3.24 ist das Ergebnis für die mit mCMV-IE1-L176A infizierte Tiergruppe (I) an den Tagen 6, 8 und 10 p.i. exemplarisch gezeigt. Vergleicht man die Amplifikations-Profile der *M55/gB*-spezifischen qPCR zwischen Pfote und Milz (Abb. 3.24AI) so ist ein zeitversetztes Ansteigen der *M55/gB* Amplifikate in der Milz zu beobachten. Erst an Tag 10 p.i. kann in der Milz in etwa das Virus-Replikations-Niveau der Pfote erreicht werden. Die entsprechenden Amplifikations-Profile der *pthrp*-spezifischen qPCRs verlaufen für Pfote und Milz (Abb. 3.24BI) annähernd identisch. Eine Berechnung der PCR-Amplifikations-Effizienz (Vgl. 3.5.2) für *M55/gB* und *pthrp* anhand der Steigungen der jeweiligen Standardkurve (Abb. 3.24AII und BII) ergab für beide Gene eine Effizienz von 100%. Abb. 3.24C zeigt eine Zusammenfassung aller Schmelzkurven, die aus den entsprechenden Amplifikaten der qPCRs für Pfote und Milz resultieren. Es ist deutlich zu erkennen, dass in beiden Teilbildern jeweils nur zwei Maxima zu beobachten sind. Diese liegen exakt bei 82,9°C bzw. 84,9°C und entsprechen den Schmelzpunkten der spezifischen *M55/gB*- bzw. *pthrp*-Amplikons. Damit sind Nukleotid-Dimere oder andere unspezifische PCR-Amplifikate, die sich negativ auf die PCR-Amplifikations-Effizienz auswirken könnten, ausgeschlossen.

Das Ergebnis der *in vivo*-Replikation ist für alle untersuchten Virusgruppen (I bis V) in Abb. 3.25 zusammengefasst gezeigt. Zu den angegebenen Zeitpunkten p.i. wurden die mittels qPCR bestimmten viralen Genome für Pfote und Milz pro 1×10^6 Zellen dargestellt. Durch lineare Regressions-Analyse unter Verwendung von Mathematica V5.0 Statistik-Software (*“Linear Regression”*; Wolfram Research Inc.) sollte die Frage beantwortet werden, ob die mCMV-IE1-Mutanten (I bis IV) im Vergleich zu mCMV-BAC-WT (V) in Pfote und Milz in gleicher Weise replizieren. Dazu wurden die in Abb. 3.25 dargestellten Regressionsgeraden berechnet.

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Geraden für den jeweils untersuchten Gewebetyp parallel verlaufen. Dies bedeutet, dass die *in vivo*-Replikation der mCMV-IE1-Mutanten im Vergleich zu mCMV-BAC-WT mit gleicher Effizienz erfolgt. Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurde zusätzlich zur *Most Probable Number* (MPN) der Geradensteigung (m , siehe Tabelle 6.7, im Anhang 6)

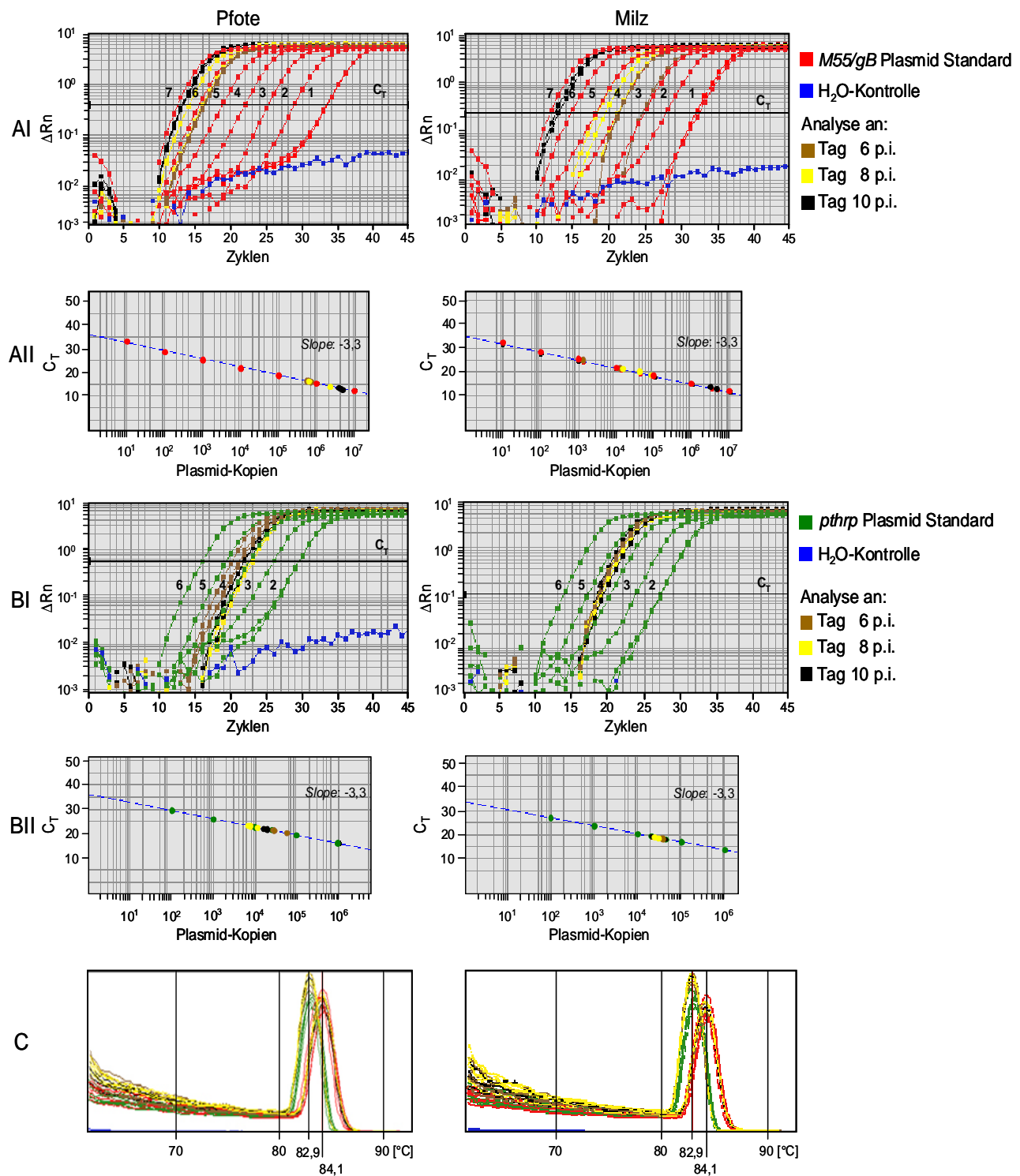


Abb. 3.24 Quantifizierung der Virus-Replikation in Milz und Pfote mittels qPCR. Die Ergebnisse sind exemplarisch für mCMV-IE1-L176A (I) an den Tagen 6 (braun), 8 (gelb) und 10 (schwarz) p.i. gezeigt. AI und BI: *TaqMan* Amplifikations-Profile der isolierten DNA-Proben aus Pfote und Milz für *M55/gB* sowie *pthrp*. AII und BII: Standardkurven der *M55/gB* bzw. *pthrp* Amplifikate. C: Schmelzdiagramme der in AI und BI dargestellten Amplifikations-Profile ($T_M = 82,9^\circ C$ *M55/gB*; $T_M = 84,1^\circ C$ *pthrp*). Die Analyse der DNA-Proben erfolgte in Triplikaten (unabhängige Verdünnungen der jeweils isolierten DNA, es wurde jeweils ein 1/100 DNA-Eluat, dies entspricht 80-200ng DNA, eingesetzt). *M55/gB* Plasmid-Standard (rot, 10^7 - 10^1 Kopien), *pthrp* Plasmid-Standard (grün, 10^6 - 10^2 Kopien). In allen Ansätzen wurde eine H_2O -Kontrolle (blau) mitgeführt, der Plasmid-Standard pDrive_gB_PTHrP_Tdy wurde linearisiert eingesetzt.

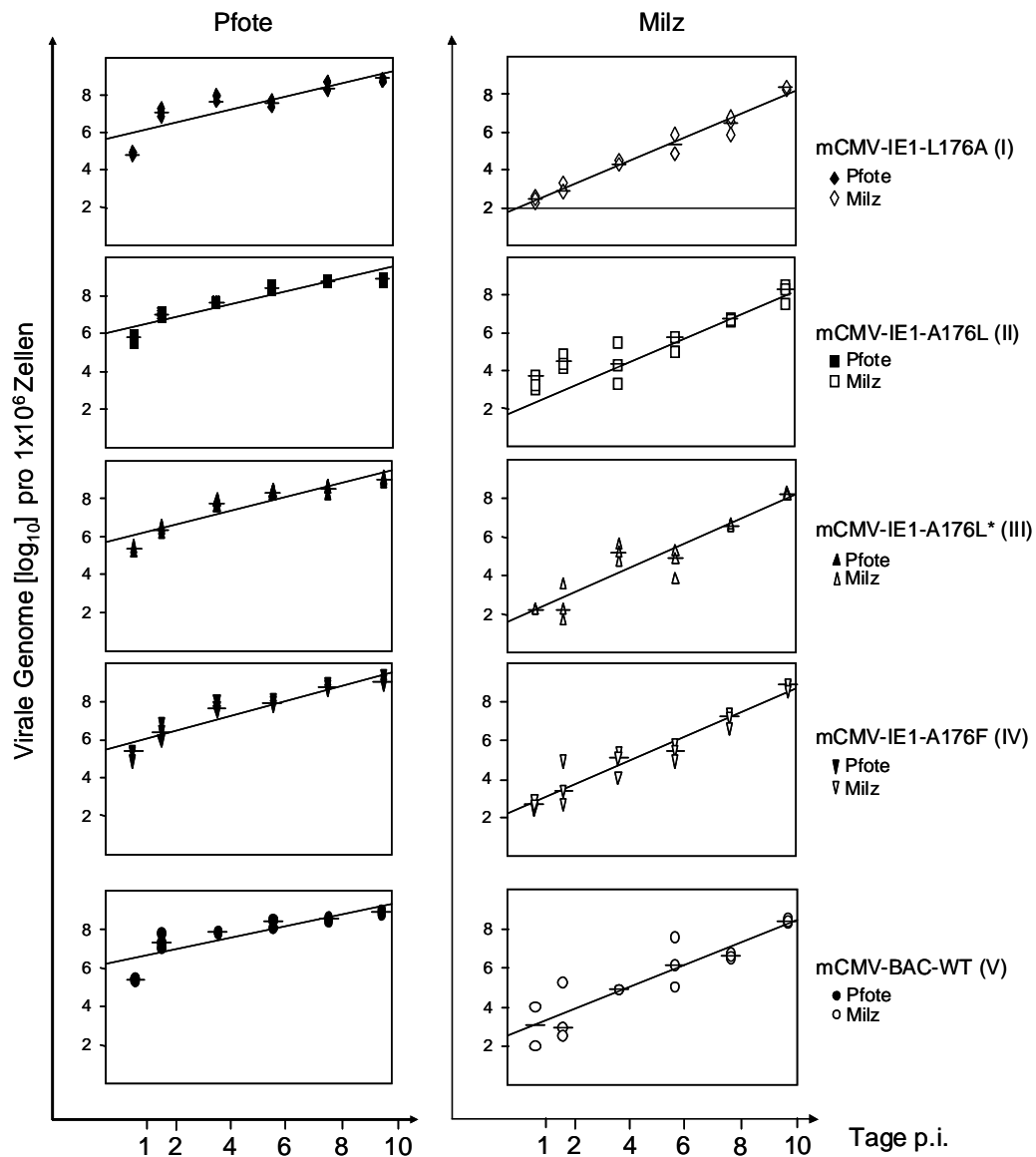


Abb. 3.25 *In vivo*-Replikation von mCMV-IE1-Mutanten im Vergleich zu mCMV-BAC-WT. Die Anzahl an viralen Genomen wurde mittels qPCR bestimmt. Zu den angegebenen Zeitpunkten p.i. sind die berechneten viralen Genome der mit den mCMV I bis V infizierten Tiergruppen pro 1×10^6 Zellen dargestellt. Je Zeitpunkt und Virusgruppe wurde die DNA aus je drei Individuen isoliert und in unabhängigen Verdünnungen der jeweils isolierten DNA getestet. Die Regressionsgeraden verlaufen nicht durch den Ursprung, weil zum Zeitpunkt $t=0$ mit 2×10^5 PFU infiziert wurde; und somit $2 \times 10^5 \text{ PFU} \times 500 \text{ Genome/PFU} = 1 \times 10^8$ Genome am Infektionsort Pfote vorliegen. Für die berechneten Genome in der Pfote an Tag 1 bedeutet dies: $1/10$ Pfote diene zur Aufreinigung der DNA; davon wurde $1/100$ eingesetzt, damit entspricht der berechnete Wert für Tag 1 ungefähr $1/1000$ der Inokulum DNA-Menge. Die Regressionsgeraden wurden durch lineare Regressions-Analyse unter Verwendung von Mathematica V5.0 Statistik-Software (*“Linear Regression”*; Wolfram Research Inc.) bestimmt. P-Werte der zufälligen, nichtlinearen Verteilung $<0,001$. Die Mediane sind mit schwarzen horizontalen Balken markiert. Zur Berechnung der jeweiligen Geradensteigungen siehe Tabelle 6.7 im Anhang 6.8.2.

für jedes Virus und für jeden Gewebetyp das 95% Konfidenzintervall der Steigung bestimmt. Bei vergleichbarer *in vivo*-Replikation sollten sich die Konfidenzintervalle der Steigungen überlappen. Tatsächlich konnte diese Bedingung sowohl für den Applikationsort Pfote als auch für die Milz eindeutig erfüllt werden (siehe Tabelle 6.7 im Anhang 6). Vergleicht man die Steigungen der

einzelnen Regressionsgeraden zwischen Pfote und Milz fällt jedoch auf, dass die Geradensteigung für die Milz um den Faktor 2 größer ist.

Zur besseren Veranschaulichung der Ergebnisse wurden mit der Gleichung $T_{\text{Doppel}} = x_t = (\log_{10}(2)/m) \times 24h$ die *in vivo*-Verdopplungszeiten (T_{Doppel}) der Viren (I bis V) für Pfote und Milz bestimmt. Dazu wurde die Geradengleichung $\log_{10}(y) = mx_t + \log_{10}b$ nach x_t aufgelöst und $y=2$ (Verdopplung) gesetzt, um die Verdopplungszeit in Stunden zu erhalten musste noch mit 24h multipliziert werden. Da T_{Doppel} nicht von $\log_{10}b$ (Y-Achsenabschnitt) abhängt, konnte dieser Term vernachlässigt werden. Die berechneten *in vivo*-Verdopplungszeiten der Viren (I bis V) sind in Tabelle 6.7 im Anhang 6 zusammengefasst und in Abb. 3.26 grafisch dargestellt. Aus Abb. 3.26 ist ersichtlich, dass eine Verdopplung der untersuchten Viren in der Pfote nach 21h, in der Milz hingegen bereits nach 11h erfolgt. Damit erfolgt die *in vivo*-Replikation in der Milz im Vergleich zur Pfote mit annähernd doppelter Geschwindigkeit.

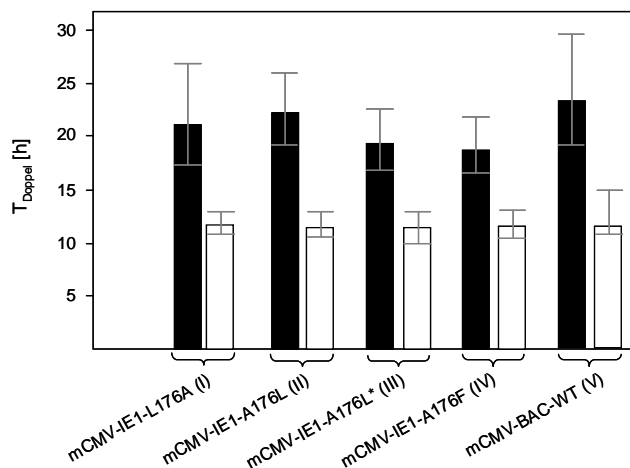


Abb. 3.26 Vergleich der *in vivo*-Verdopplungszeiten von mCMV-IE1-Mutanten mit mCMV-BAC-WT in Pfote und Milz. Die Balken repräsentieren die *Most Probable Numbers* (MPNs) der *in vivo*-Verdopplungszeit (T_{Doppel}) der untersuchten Viren I-V bestimmt durch lineare Regressions-Analyse unter Verwendung von Mathematica V5.0 Statistik-Software (*“Linear Regression”*; Wolfram Research Inc.). Die „Fehlerbalken“ stellen das 95% Konfidenzintervall dar. Für alle Berechnungen waren die P-Werte der zufälligen, nichtlinearen Verteilung $<0,001$. Schwarze Balken: Pfote, weiße Balken: Milz. Zur Berechnung von T_{Doppel} siehe Tabelle 6.7 im Anhang 6.8.2.

3.8.1.2 Quantifizierung der Virus-Replikation durch Immunhistologie der Leber

Nachdem mittels qPCR eindrucksvoll gezeigt werden konnte, dass die Rekombinanten mCMV-IE1-L176A, mCMV-IE1-A176L, mCMV-IE1-A176L* und mCMV-IE1-A176F gegenüber mCMV-BAC-WT keine Attenuierung der *in vivo*-Replikation in Pfote und Milz aufweisen, sollte nun geprüft werden ob dies auch in einem weiteren für die mCMV-Erkrankung wichtigen Organ, der Leber, zutrifft. Die *in vivo*-Replikation der mCMV-IE1-Mutanten in der Leber wurde im Unterschied zu Pfote und Milz durch den immunhistochemischen (IHC) Nachweis des IE1-Proteins erfasst. Nach Infektion mit mCMV wird u. a. das virale IE1-Protein (pp76/89) in großer Menge produziert und bleibt während der gesamten Replikation im Nukleus lokalisiert, wobei es in der späten Phase in

einem intranukleären Einschlusskörper kondensiert vorliegt. Durch den IHC IE1-Nachweis ist es daher möglich, mCMV-infizierte Zellen aller Phasen und nicht nur Zellen der Spätphase zu detektieren. Deshalb wurde die Replikation der mCMV-IE1-Mutanten in der Leber mit Hilfe der besonders sensitiven IHC-Methode anhand von intranukleärem IE1-Protein nachgewiesen.

Dazu wurden die Lebern von je drei Tieren der jeweiligen Versuchsgruppe (I bis V, siehe Abb. 3.23) an den Tagen 2, 4, 6, 8 und 10 p.i. in der IHC untersucht. Dabei entstammen die entnommenen Lebern aus denselben Tieren, deren DNA aus Pfote und Milz mittels qPCR (siehe 3.8.1.1) analysiert wurde. Das Ergebnis der immunhistochemischen Untersuchung ist in Abb. 3.27 exemplarisch für je eine Leber, aus mit den entsprechenden Viren (I bis V) infizierten Tieren, für die Tage 6, 8 und 10 p.i. dargestellt. Im Verlauf der Kinetik ist für alle untersuchten mCMV eine deutliche Zunahme der Zahl infizierter Hepatozyten zu erkennen. Anhand dieser Abbildung konnte qualitativ, sowohl zwischen den einzelnen mCMV-IE1-Mutanten als auch im Vergleich zu mCMV-BAC-WT, kein Unterschied in der viralen Replikation festgestellt werden. Um diesen Befund auch quantitativ zu bestätigen, wurde die Anzahl an schwarz markierten Zellen für einen repräsentativen Bereich von 10mm² in Leberschnitten ausgezählt. Die Ergebnisse der Auszählung infizierter Zellen der untersuchten Viren für die Tage 2, 4, 6, 8 und 10 p.i. sind für jedes Tier in Abb. 3.28A gezeigt. Analog zu der bereits in Kapitel 3.8.1.1 beschriebenen Vorgehensweise konnte auch für die Leber durch lineare Regressions-Analyse unter Verwendung von Mathematica V5.0 Statistik-Software ("Linear Regression"; Wolfram Research Inc.) eindeutig bewiesen werden, dass die mittels BAC-Mutagenese generierten mCMV-IE1-Mutanten im Vergleich zu mCMV-BAC-WT in gleicher Weise replizieren. Dazu wurde unter Verwendung der jeweils berechneten Regressionsgleichungen der entsprechenden Regressionsgeraden eines jeden Virus sowohl das Zeitintervall (Z) des Erreichens in der Leber als auch die *in vivo*-Verdopplungszeit (T_{Doppel}) ermittelt (Abb. 3.28A,B). Das Zeitintervall (Z) errechnet sich aus der allgemeinen Geradengleichung $\log_{10}(y)=mx_t+\log_{10}b$ mit $y=10^0$ (zur genauen Berechnung von Z siehe Tabelle 6.8 im Anhang 6). Alle getesteten Viren sind nach ca. 3 Tagen in 10mm² Lebergewebe nachweisbar (Abb. 3.28A). Eine Verdopplung der untersuchten Viren in der Leber erfolgt im Mittel nach ca. 16h. Somit zeigten die Rekombinanten mCMV-IE1-L176A, mCMV-IE1-A176L, mCMV-IE1-A176L* und mCMV-IE1A176F hinsichtlich ihrer *in vivo*-Replikation auch in Hepatozyten keinerlei Attenuierung. Die Ergebnisse dieser Berechnungen sind in Tabelle 6.8 im Anhang 6 zusammengefasst.

Schlussfolgerung: Wie bereits für Pfote und Milz gezeigt werden konnte, replizieren die Rekombinanten mCMV-IE1-L176A, mCMV-IE1-A176L, mCMV-IE1-A176L* und mCMV-IE1-A176F im Vergleich zu mCMV-BAC-WT auch in der Leber in gleicher Weise. Die inserierten Punktmutationen im Codon der MHC-Klasse-I-Ankeraminosäure des IE1-Peptids zeigten somit unter immunsuppressiven Bedingungen keinen Einfluss auf die *in vivo*-Replikation in den untersuchten Geweben.

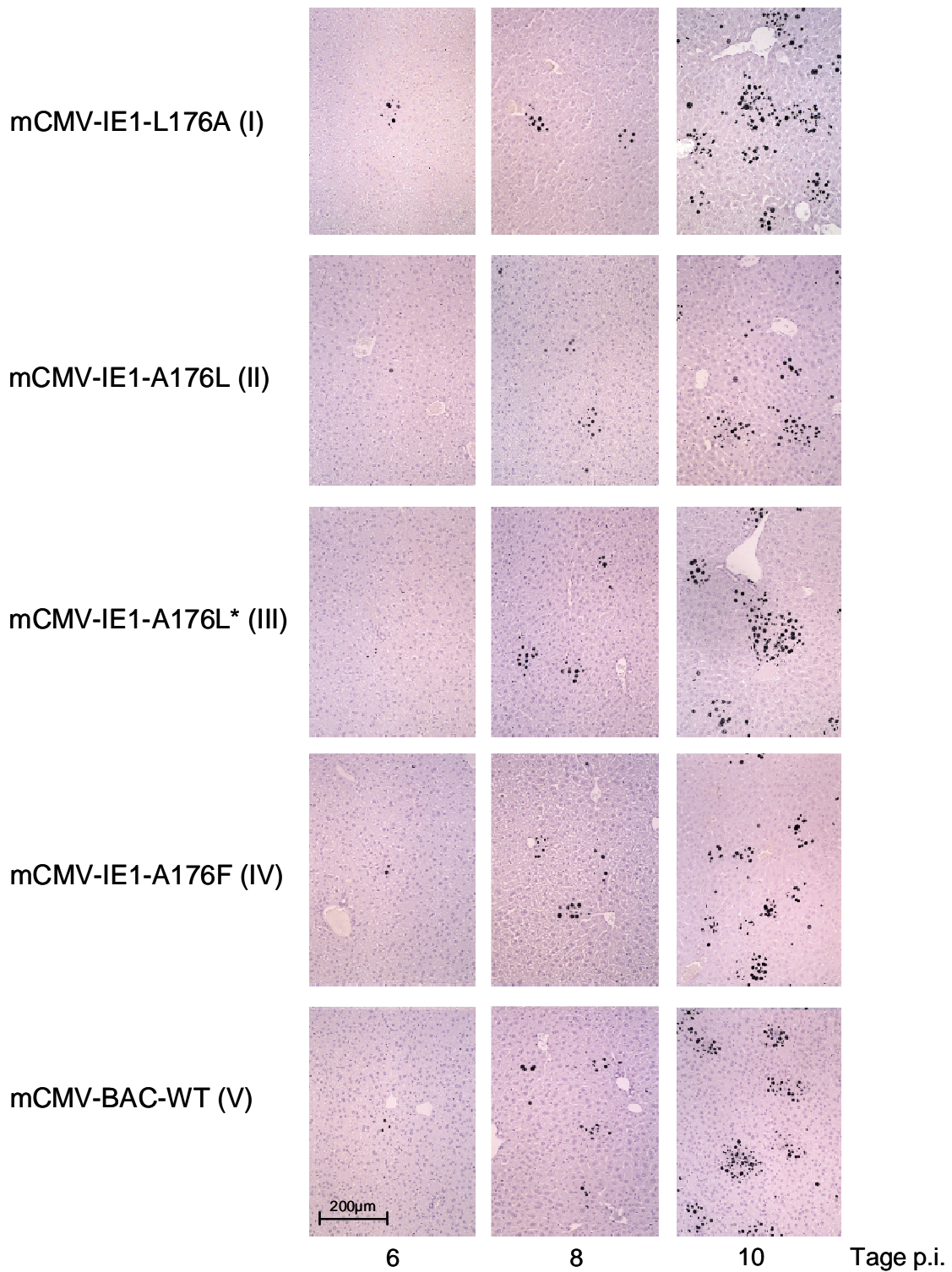


Abb. 3.27 Immunhistologischer Nachweis der *in vivo*-Replikation von mCMV-IE1-Mutanten im Vergleich zu mCMV-BAC-WT. Nachweis von intranukleärem IE1-Protein (pp89) in der Leber mit der immunhistologischen ABC-Methode, exemplarisch an je einer Leber an den Tagen 6, 8 und 10 p.i. für das jeweilige Virus (I bis V) gezeigt. IE1-positive Zellkerne erscheinen schwarz. Gegenfärbung Hämalaun. Balken entspricht 200µm.

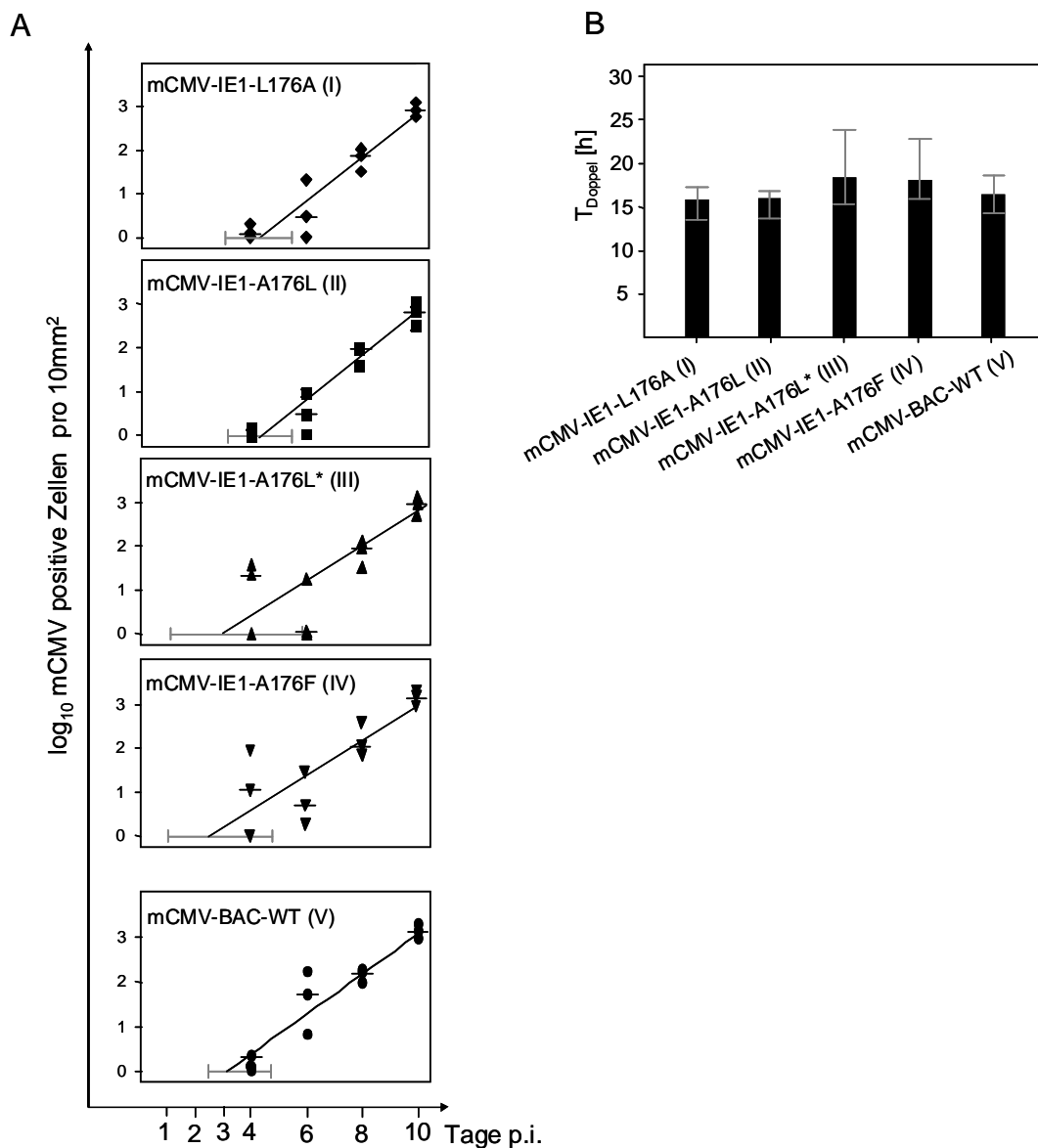


Abb. 3.28 Kinetik der *in vivo*-Replikation von mCMV-IE1-Mutanten im Vergleich zu mCMV-BAC-WT in der Leber. A: Die Zahl der infizierten Zellen in der Leber wurde immunhistologisch (siehe Abb. 3.27) für die Tage 2, 4, 6, 8 und 10 p.i. repräsentativ für eine Fläche von 10mm^2 ermittelt. Pro Analyse-Tag wurden die Lebern von je drei Tieren untersucht. Die Regressionsgeraden wurden durch lineare Regressions-Analyse unter Verwendung von Mathematica V5.0 Statistik-Software ("Linear Regression"; Wolfram Research Inc.) bestimmt. P-Werte der zufälligen, nichtlinearen Verteilung $<0,001$. Die Mediane sind mit schwarzen horizontalen Balken markiert. Horizontale graue Balken, Zeitintervall (Z) in dem die getesteten Viren die Leber erreichen. B: Die Balken repräsentieren die *Most Probable Numbers* (MPNs) der *in vivo* Verdopplungszeit (T_{Doppel}) der untersuchten Viren I-IV bestimmt durch lineare Regressions-Analyse. Die „Fehlerbalken“ stellen das 95% Konfidenzintervall dar. Zur Berechnung der jeweiligen Geradensteigungen sowie von Z und T_{Doppel} siehe Tabelle 6.8 im Anhang 6.8.2.

3.9 Immunologische Charakterisierung der MHC-Klasse-I-Anker-Mutanten

Auf molekularer Ebene konnte durch Sequenzierung der entsprechenden mCMV-BAC-Plasmide (siehe 3.4.4.2) der Beweis erbracht werden, dass die via BAC-Mutagenese generierten Mutationen in den immundominanten Peptiden IE1 und m164 – einzeln oder in Kombination – durch Austausch der jeweiligen C-terminalen MHC-Klasse-I-Ankeramino­säure (X→A) korrekt sind. Ein Austausch der Aminosäure X am C-Terminus soll zu einer Zerstörung der jeweils betroffenen CD8 T-Zellepitope führen. Infolgedessen können CD8 T-Zellen mit Spezifität für das jeweils betroffene Peptid nicht mehr gebildet werden. Mit *ex vivo* isolierten CD8 T-Zellen sollte nun geprüft werden, ob die erzeugten Mutationen tatsächlich zu einem Verlust IE1- bzw. m164-Peptid-spezifischer CD8 T-Zellen führten. Eine wichtige Voraussetzung dafür war der in Kapitel 3.8 erbrachte Nachweis, dass die generierten mCMV-IE1-Mutanten *in vivo* mit vergleichbarer Effizienz replizieren.

3.9.1 Funktionelle Verifikation der IE1-Funktionsverlust-Mutante im *ELISpot*-Assay

Nach Infektion mit der IE1-Funktionsverlustmutante mCMV-IE1L176A sollte durch den Austausch der C-terminalen MHC-Ankeramino­säure im IE1-Peptid (L176A) die Prozessierung am Proteasom und die Bindung an das präsentierende MHC-Klasse-I-Allel L^d verhindert werden. Dadurch können mit mCMV-IE1-L176A infizierte Zellen kein IE1-Peptid präsentieren und somit können auch keine IE1-Peptid-spezifischen CD8 T-Zellen generiert werden. Dagegen sollten in Tieren, die mit einer korrespondierenden Revertante; z.B. mit mCMV-IE1A176L infiziert wurden, wieder IE1-Peptid-spezifische CD8 T-Zellen nachweisbar sein.

Um dies zu prüfen, wurden immunkompetente BALB/c Mäuse intraplantar mit 2×10^5 PFU Mutante oder Revertante infiziert. Nach immunomagnetischer Aufreinigung der CD8 T-Zellen (siehe 2.12.3) aus den drainierenden Lymphknoten (Tag 8 p.i.) sowie aus der Milz (5 Monate p.i.) wurde im *ELISpot*-Assay die Frequenz Peptid-spezifischer CD8 T-Zellen bestimmt.

Als Antigen-präsentierende Zellen (APZ) diente die mit dem humanen B7-1 (CD80) transfizierte Mastozytoma-Zelllinie P815. Zur Induktion einer Peptid-spezifischen T-Zell Aktivierung wurden die P815-B7 mit synthetischen mCMV-Peptiden beladen. Die dabei verwendeten IE1-Peptide unterschieden sich in ihrem jeweiligen C-Terminus 168-YPHFMPTN-X-176. Neben dem natürlichen IE1-Peptid X=L wurden noch zwei weitere Peptide mit X=A und X=F eingesetzt. Die Aminosäure A am C-Terminus des IE1-Peptids führt zu einem Antigenitätsverlust um mindestens 6 log₁₀-Stufen aufgrund ineffizienter Bindung der C-terminalen Aminosäure A in die Bindungsgrube des MHC-Klasse-I-Moleküls. Das Peptid mit X=F bindet hingegen mit vergleichbarer Affinität, wie das natürlich prozessierte IE1-Peptid, an das MHC-Klasse-I-Molekül L^d (Reddehase & Koszinowski 1991; Rognan et al., 1992). Um festzustellen, ob die Frequenz der m164-Peptid-spezifischen CD8 T-Zellen, der zweiten immundominanten Spezifität neben IE1 (Holtappels et al.,

2002a), nach Deletion des IE1-Peptids verändert ist, wurden Zielzellen auch mit synthetischem m164-Peptid beladen. Als Kontrolle dienten unbeladene APZ.

Durch polyklonale Stimulation mit 145-2C11 Hybridomzellen, die den monoklonalen Antikörper gegen Maus CD3 ϵ produzieren (α CD3 ϵ), konnte die Gesamtreaktivität in einem CD3 ϵ -redirigierten *ELISpot*-Assay (Holtappels et al., 2000b, 2001) ermittelt werden.

Die Ergebnisse des *ELISpot*-Assays (siehe Abb. 3.29A) zeigen, dass CD8 T-Zellen aus mCMV-IE1-L176A infizierten Tieren nicht durch die mit den verschiedenen IE1-Peptiden (168-YPHFMPTN-X-176, siehe Abb. 3.29A) beladenen APZs stimuliert werden konnten. Dies galt sowohl für CD8 T-Zellen aus dem drainierenden Lymphknoten akut infizierter Tiere als auch für Memory CD8 T-Zellen aus der Milz. Damit war bewiesen, dass nach Infektion mit mCMV-IE1-L176A keine IE1-L-Peptid-spezifischen CD8 T-Zellen mehr induziert worden waren. Hingegen konnten aus mit mCMV-IE1-A176L infizierten Mäusen (siehe Abb. 3.29B) sowohl in der akuten Infektionsphase als auch in der Memory Phase der Infektion wieder IE1-L-Peptid-spezifische CD8 T-Zellen nachgewiesen werden. Dabei war die Frequenz der IE1-L-Peptid-spezifischen CD8 T-Zellen nach Inkubation mit 168-YPHFMPTN-L-176 bzw. mit 168-YPHFMPTN-F-176 beladenen P815-B7 vergleichbar (ca. 1% von allen CD8 T-Zellen). Wie zu erwarten, wurde das Peptid 168-YPHFMPTN-A-176 nicht erkannt.

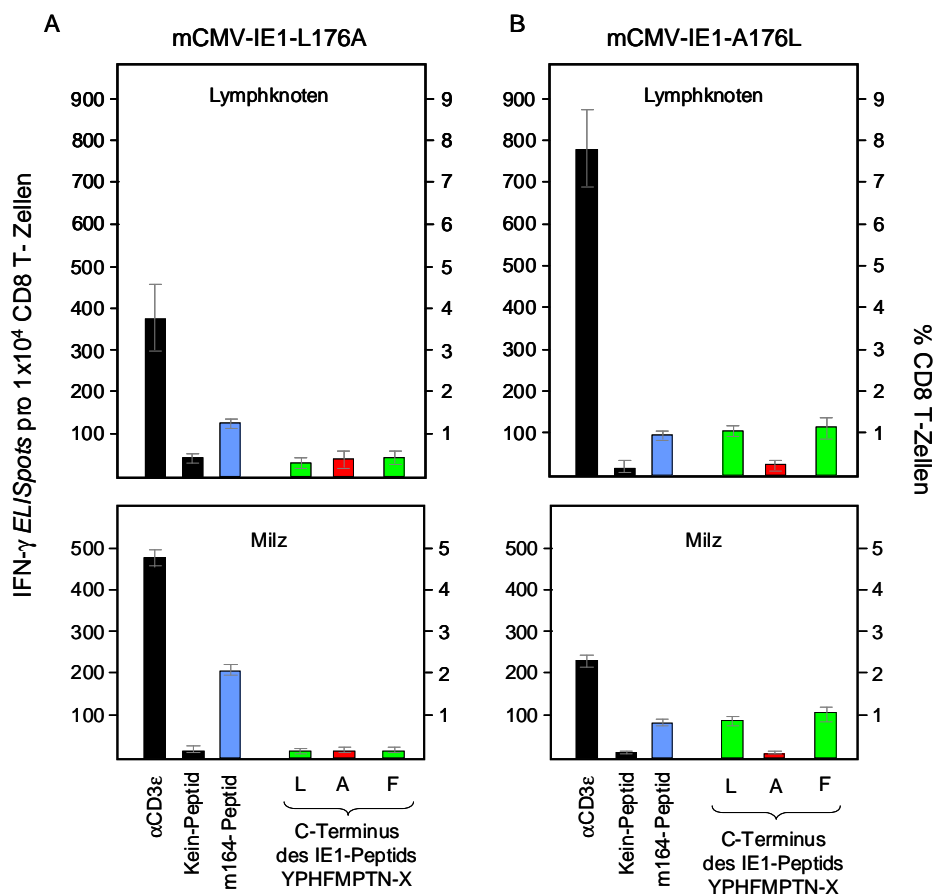


Abb. 3.29 Funktionelle Verifikation der IE1-Funktionsverlust-Mutante im *ELISpot*-Assay. Immunkompetente BALB/c Mäuse wurden intraplantar entweder mit 2×10^5 PFU mCMV-IE1-L176A (A) oder mCMV-IE1-A176L (B) infiziert. Die Frequenz Peptid-spezifischer CD8 T-Zellen aus drainierenden

Lymphknoten 8 Tage bzw. aus Milzen 5 Monate p.i. wurde in einem *ELISpot-Assay*, basierend auf individueller IFN- γ Sekretion Peptid-stimulierter CD8 T-Zellen, bestimmt. CD8 T-Zellen wurden mittels immunomagnetischer Zellsortierung aufgereinigt und anschließend stimuliert, entweder polyklonal durch *cross-linking* mit anti-CD3 ϵ nach Stimulation mit 145-2C11 Hybridomzellen oder spezifisch nach Beladung von P815-B7 mit 10^{-8} M der angegebenen synthetischen Peptide. Als Kontrollen dienten unbeladene (kein Peptid) P815-B7. Die Frequenzen sind sowohl als Zahl IFN- γ -sezernierender Zellen (links) als auch in Prozent aller CD8 T-Zellen (rechts) angegeben. Balken repräsentieren die *Most Probable Numbers* (MPNs) bestimmt durch lineare Regressions-Analyse der Effektorzell-Titrations unter Verwendung von Mathematica V4.2.1 Statistik-Software ("*Linear Regression*"; Wolfram Research Inc.). Fehlerbalken stellen das 95% Konfidenzintervall dar, P-Werte der zufälligen, nichtlinearen Verteilung $<0,001$. Eine detaillierte Auflistung der berechneten T-Zellfrequenzen befindet sich im Anhang 6.2.1.

Die Memory-Frequenz m164-spezifischer CD8 T-Zellen nach Infektion mit mCMV-IE1-L176A (Abb. 3.29A) scheint im Vergleich zu der entsprechenden Frequenz nach Infektion mit mCMV-IE1-A176L (Abb. 3.29B) um den Faktor 2 erhöht zu sein. Normiert man jedoch die Peptid-spezifischen Frequenzen auf die Gesamtreaktivität der CD8 T-Zellen, so nivelliert sich dieser scheinbare Unterschied.

Schlussfolgerung:

1. Nach Infektion mit der Mutante mCMV-IE1-L176A sind sowohl in akut als auch in latent infizierten Tieren keine IE1-Peptid-spezifischen CD8 T-Zellen mehr nachweisbar. Damit war die Funktionalität der Mutante *in vivo* bestätigt.
2. In Tieren, die mit einer korrespondierenden Revertante mCMV-IE1-A176L infiziert wurden, konnten wieder IE1-Peptid-spezifische CD8 T-Zellen nachgewiesen werden.
3. Die Frequenz von m164-spezifischen CD8 T-Zellen scheint durch den Ausfall an IE1-Peptid-spezifischen CD8 T-Zellen nicht beeinflusst zu werden.

3.9.2 Untersuchung von mCMV-Peptid-spezifischen T-Zellfrequenzen nach Infektion mit verschiedenen mCMV-Rekombinanten

Nachdem im vorangegangenen Kapitel der Antigenitätsverlust für mCMV-IE1-L176A im *ELISpot-Assay* eindeutig bewiesen worden war, sollte nun analog untersucht werden, ob dies auch für die m164-Funktionsverlustmutante (mCMV-m164-I265A) bzw. mCMV-IE1-L176A-m164-I265A (Doppelmutante) zutrifft. Gleichzeitig sollte dabei die Frage beantwortet werden, ob die Ausschaltung der immundominanten Peptide IE1 und m164 - einzeln oder in Kombination - zu einer Veränderung der CD8 T-Zellfrequenzen bekannter Spezifität (zur Übersicht siehe Reddehase, 2002) von mCMV führt. Die Versuchsdurchführung ist in Abb. 3.30 schematisch dargestellt.

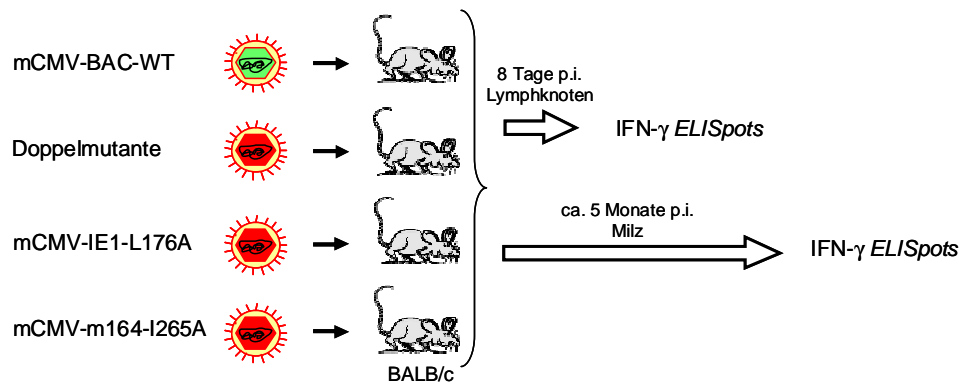


Abb. 3.30 Versuchsverlauf zur Untersuchung der mCMV-Peptid-spezifischen T-Zellfrequenzen nach Infektion mit verschiedenen mCMV-Rekombinanten. Immunkompetente BALB/c Mäuse wurden intraplantar entweder mit 2×10^5 PFU mCMV-BAC-WT (Kontrolle) oder mit den angegebenen Mutanten infiziert. Die Frequenzen der Peptid-spezifischen CD8 T-Zellen aus akut infizierten bzw. Memory-infizierten Tieren wurden in einem *ELISpot*-Assay bestimmt.

Immunkompetente BALB/c Mäuse wurden intraplantar mit 2×10^5 PFU der in Abb. 3.30 dargestellten mCMV infiziert. 8 Tage p.i. wurden CD8 T-Zellen aus drainierenden Lymphknoten isoliert und durch immunomagnetische Zellsortierung gereinigt. Zur quantitativen Analyse der Epitop-spezifischen CD8 T-Zellfrequenzen im *ELISpot*-Assay wurden die gereinigten CD8 T-Zellen titriert und anschließend in Triplikaten entweder polyklonal durch *cross-linking* mit α CD3 ϵ oder spezifisch nach Beladung von P815-B7 mit 10^{-8} M der in Abb. 3.31 angegebenen synthetischen Peptide stimuliert.

Die Ergebnisse der IFN- γ *ELISpots* in Abb. 3.31A belegen, dass nach Infektion mit mCMV-m164-I265A die m164-Peptid-spezifischen CD8 T-Zellen ausgelöscht sind. Nach Infektion mit der Doppelmutante sind zusätzlich auch die IE1-Peptid-spezifischen CD8 T-Zellen ausgeschaltet. Der bereits gezeigte Verlust IE1-Peptid-spezifischer CD8 T-Zellen nach Infektion mit mCMV-IE1-L176A konnte also erneut bestätigt werden. Die Gesamtreaktivität der CD8 T-Zellen war für die 4 getesteten Viren vergleichbar. Die Frequenz der dominanten IE1- und m164-Peptid-spezifischen CD8 T-Zellen nach Infektion mit mCMV-BAC-WT (Kontrolle) betrug ca. 65 pro 1×10^4 CD8 T-Zellen; dies entspricht 0,65%. Nach Auslöschung einer der beiden dominanten Spezifitäten erhöhte sich die Frequenz der jeweils verbleibenden Spezifität nur geringfügig von 0,65% auf ca. 0,95%. Außerdem zeigte sich die Frequenz m18-Peptid-spezifischer CD8 T-Zellen - besonders nach Auslöschung beider immundominanter Epitope - leicht, aber statistisch signifikant und reproduzierbar (Daten nicht gezeigt) erhöht. Um etwaige Fehlinterpretationen, verursacht durch geringfügige Schwankungen der Gesamtreaktivität, auszuschließen, wurden die ermittelten Peptid-spezifischen CD8 T-Zellfrequenzen auf Prozent α -CD3 ϵ -reaktiver CD8 T-Zellen normiert. Das Ergebnis ist in Abb. 3.31B gezeigt. Dabei fällt für dieses Experiment auf, dass nach Infektion mit mCMV-164-I265A, also nach Wegfall der m164-Peptid-spezifischen CD8 T-Zellen, die Frequenz der verbleibenden IE1-Peptid-spezifischen CD8 T-Zellen um einen Faktor von ~ 2 erhöht ist. Erfahrungen in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Holtappels-Geginat (Institut für Virologie, Mainz)

haben gezeigt, dass IE1-spezifische T-Zellfrequenzen erheblichen Schwankungen unterliegen. Aus diesem Grund kann an dieser Stelle nicht entschieden werden, ob die detektierte Frequenzerhöhung auf die Zerstörung des m164-Peptids zurückzuführen ist. Die leichte, aber signifikante Erhöhung der Frequenz m18-Peptid-spezifischer CD8 T-Zellen konnte auch nach Normierung bestätigt werden. Eine Änderung in der Hierarchie der übrigen Epitop-spezifischen CD8 T-Zellfrequenzen, unabhängig davon ob die beiden dominanten Epitope einzeln oder in Kombination ausgeschaltet waren, konnte nicht nachgewiesen werden.

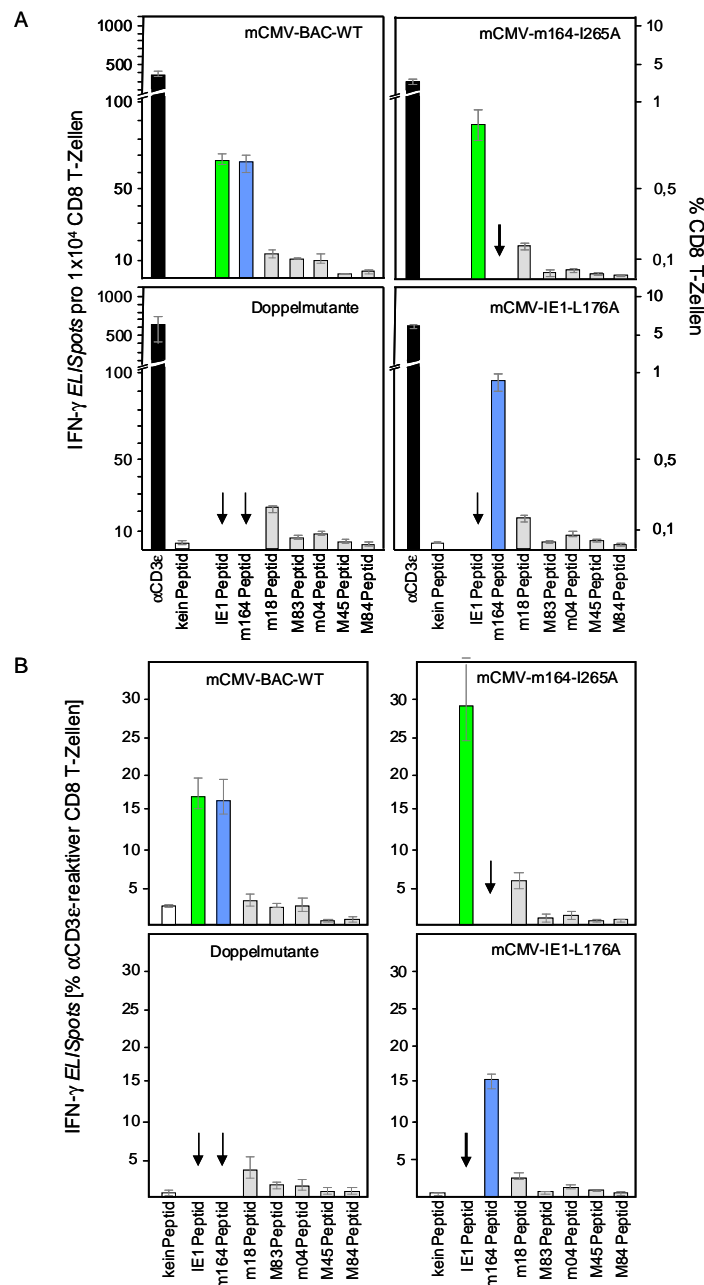


Abb. 3.31 Analyse mCMV-Peptid-spezifischer CD8 T-Zellfrequenzen nach akuter Infektion mit verschiedenen mCMV-Mutanten. A: Die Frequenz Peptid-spezifischer CD8 T-Zellen aus akut infizierten Lymphknoten 8 Tage p.i. wurde im *ELISpot*-Assay basierend auf individueller IFN- γ Sekretion Peptid-stimulierter CD8 T-Zellen ermittelt. Die CD8 T-Zellen wurden durch immunomagnetische Zellsortierung aufgereinigt und stimuliert, entweder polykonal durch *cross-linking* mit anti-CD3 ϵ oder spezifisch nach Beladung von P815-B7 mit 10^{-8} M der angegebenen synthetischen Peptiden. Als Kontrollen dienten unbeladene (kein Peptid) P815-B7. Die Frequenzen sind sowohl als Zahl IFN- γ -sezernierender Zellen (links)

als auch in Prozent aller CD8 T-Zellen (rechts) angegeben. Das Fehlen von Peptid-spezifischen CD8 T-Zellen ist durch Pfeile gekennzeichnet. Statistische Berechnungen siehe Legende Abb. 3.29. B: Normierung der Peptid-spezifischen CD8 T-Zellfrequenzen aus Teilbild A auf Prozent α CD3 ϵ -reaktiver CD8 T-Zellen. Die Balken repräsentieren den Konfidenzquotienten (Q) mit $Q = (MPN_{Peptid} / MPN_{\alpha CD3\epsilon})$. Das Konfidenzintervall (QI) des Konfidenzquotienten (Q) errechnet sich aus $QI = \Delta(Q_{upper}, Q_{lower})$; $Q_{lower} = (LCL_{Peptid} / UCL_{\alpha CD3\epsilon})$ und $Q_{upper} = (UCL_{Peptid} / LCL_{\alpha CD3\epsilon})$. MPN: *Most Probable Number*, UCL_x bzw. LCL_x : (Upper bzw. Lower Confidence Limit; oberes 95% bzw. unteres 95% Konfidenz-Limit); x=Peptid oder α CD3 ϵ .

Für andere Virusinfektionen gibt es Hinweise darauf, dass sich die Spezifität des T-Zell Repertoires während der Konstitution der primären Immunantwort von dem entsprechenden Repertoire der Memory T-Zellantwort unterscheidet (Van der Most et al., 1996; Bergmann et al., 1999). Vor diesem Hintergrund wurden analog zur akuten Infektion auch die Frequenzen mCMV-Epitop-spezifischer memory CD8 T-Zellen aus der Milz bestimmt. Diese Phase ist dadurch charakterisiert, dass nach Auflösung der produktiven Infektion virale Latenz etabliert wird (Kurz et al., 1997).

Die Ergebnisse des *ELISpot-Assays* (siehe Abb.3.32A) bestätigen auch für die Latenz die erfolgreiche Ausschaltung von jeweils einem oder beider dominanter T-Zellspezifitäten nach Infektion mit der entsprechenden Mutante. Wie bereits für die akute Infektion gezeigt werden konnte, ist auch die Gesamtreaktivität der CD8 T-Zellen für alle 4 Virusgruppen vergleichbar. Dagegen konnte die während der produktiven Infektion beobachtete Frequenzerhöhung IE1-Peptid-spezifischer CD8 T-Zellen nach Auslöschung der m164-Antigenität in der Memory Phase nicht bestätigt werden. Jedoch scheint in der Latenz die Frequenz m164-Peptid-spezifischer CD8 T-Zellen nach Infektion mit mCMV-IE1-L176A im Vergleich zur Kontrolle minimal erhöht zu sein. Die leichte aber signifikante Frequenzerhöhung m18-Peptid-spezifischer CD8 T-Zellen - besonders nach Auslöschung beider immundominanter Epitope – konnte auch in der Latenz bestätigt werden. Zur genaueren Interpretation der Peptid-spezifischen Memory CD8 T-Zellfrequenzen wurde auch hier eine Normierung auf Prozent α CD3 ϵ -reaktiver CD8 T-Zellen durchgeführt (siehe Abb. 3.32B). Das Ergebnis konnte die vorangegangenen Aussagen eindeutig bestätigen. Die Frequenz m164-Peptid-spezifischer CD8 T-Zellen war nach Auslöschung des IE1-Peptids im Vergleich zur Kontrolle geringfügig erhöht. Ebenso konnte die Frequenzerhöhung der m18-Peptid-spezifischen CD8 T-Zellen verifiziert werden. Analog zur akuten Infektion blieb die Frequenzhierarchie der übrigen Epitop-spezifischen Memory CD8 T-Zellen durch den Wegfall eines oder beider dominanter Epitope unverändert.

Schlussfolgerung:

1. Nach Infektion von BALB/c Mäusen mit den Mutanten mCMV-IE1-L176A, mCMV-m164-I265A sowie der Doppelmutante waren die korrespondierenden CD8 T-Zellspezifitäten tatsächlich völlig ausgelöscht. In den Revertanten war dagegen die Erkennung der Epitope wieder hergestellt.
2. Die Frequenz m18-Peptid-spezifischer CD8 T-Zellen - besonders nach Auslöschung beider immundominanter Epitope - war leicht aber signifikant und reproduzierbar erhöht.

- Die Fähigkeit der Mutanten, CD8 T-Zellspezifitäten der nicht mutierten Epitope *in vivo* zu aktivieren, konnte sowohl in der akuten als auch in der Memory Phase der Immunantwort bewiesen werden.
- Die Hierarchie der übrigen Epitop-spezifischen CD8 T-Zellen wurde durch den Wegfall der dominanten Peptide nicht verändert.

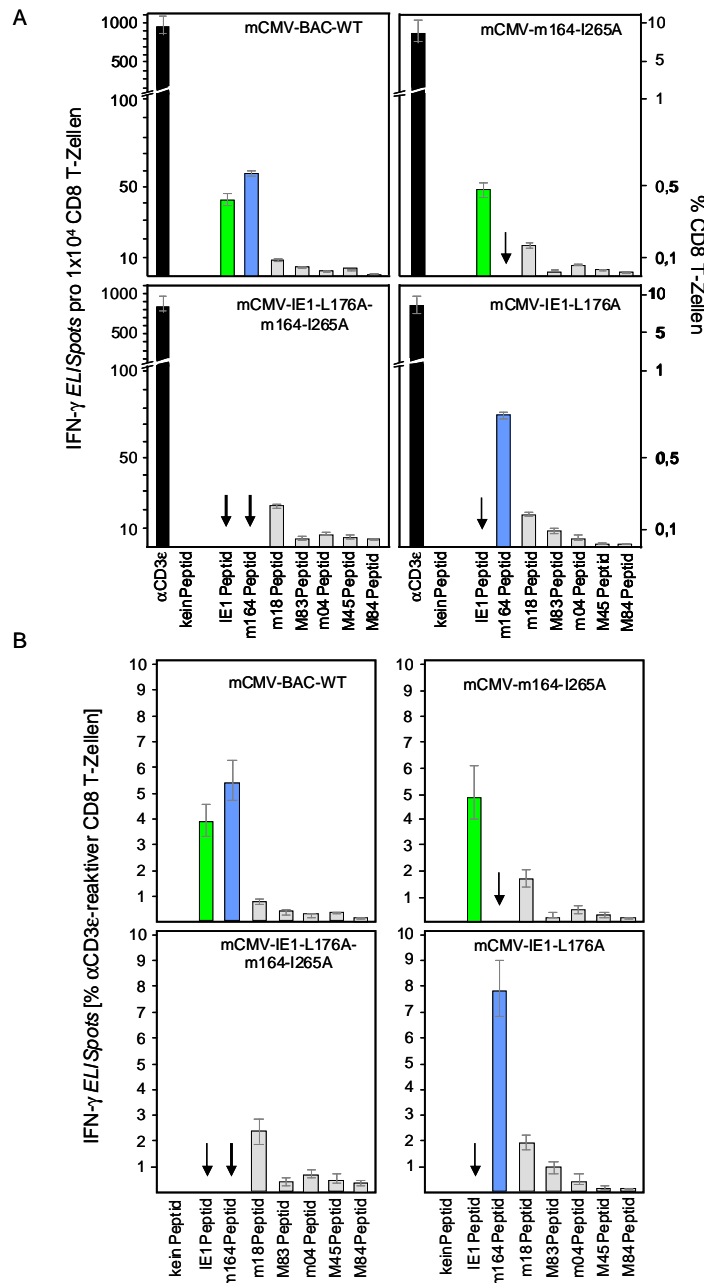


Abb. 3.32 Analyse mCMV-Peptid-spezifischer Memory CD8 T-Zellfrequenzen nach Infektion mit verschiedenen mCMV-Mutanten. A: Die Frequenz Peptid-spezifischer Memory CD8 T-Zellen aus der Milz ca. 5 Monate p.i. wurde im *ELISpot*-Assay basierend auf individueller IFN- γ Sekretion Peptid-stimulierter CD8 T-Zellen ermittelt (Details siehe Legende Abb. 3.31). B: Normierung der Peptid-spezifischen CD8 T-Zellfrequenzen aus Teilbild A auf Prozent α CD3 ϵ -reaktiver CD8 T-Zellen (Details siehe Legende Abb.3.31).

3.10 Herstellung rekombinanter mCMV mittels Ein-Schritt-Rekombinationsverfahren

Nach erfolgreicher Etablierung der in Kapitel 2.11.1 beschriebenen Zwei-Schritt-Rekombinationsmutagenese, sollte nun eine weitere Methode zur Herstellung rekombinanter mCMV-BAC-Plasmide, das Ein-Schritt-Rekombinationsverfahren, in der Arbeitsgruppe etabliert werden. 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; sowie insbesondere Wagner & Koszinowski 2004.

Das Prinzip dieser Methode (siehe Abb. 3.33) beruht auf der Insertion eines linearen PCR-Fragments, welches über ein Doppel-*Crossing-over* (zweifaches Rekombinationsereignis) in das mCMV-BAC-Plasmid integriert wird. Das lineare PCR-Fragment beinhaltet einen Selektionsmarker und die für die homologe Rekombination benötigten viralen Homologiebereiche.

In der vorliegenden Arbeit diente das Ein-Schritt-Rekombinationsverfahren zur Insertion einer Epitop-Sequenz an das 3'- bzw. 5'-Ende des viralen Proteins aus dem ORF *m164*. Über die Funktion des ORF_{m164}-Proteins ist bisher nichts bekannt. Die einzufügende Epitop-Sequenz kodiert für ein Peptid -YPYDVPDYA- aus dem Hämagglutininprotein (HA) (Wilson et al., 1984) des Influenza-A-Virus. Gegen dieses Epitop existieren spezifische Antikörper, die den Nachweis des HA-Fusionsproteins erlauben. Dies ermöglicht die Aufklärung der intrazellulären Lokalisation des HA-markierten viralen Proteins und liefert damit eventuell erste Anhaltspunkte zu einer möglichen Funktion.

Ein detailliertes und optimiertes Versuchsprotokoll zur Durchführung der im Folgenden beschriebenen Mutagenesen befindet sich in Kapitel 2.11.2.

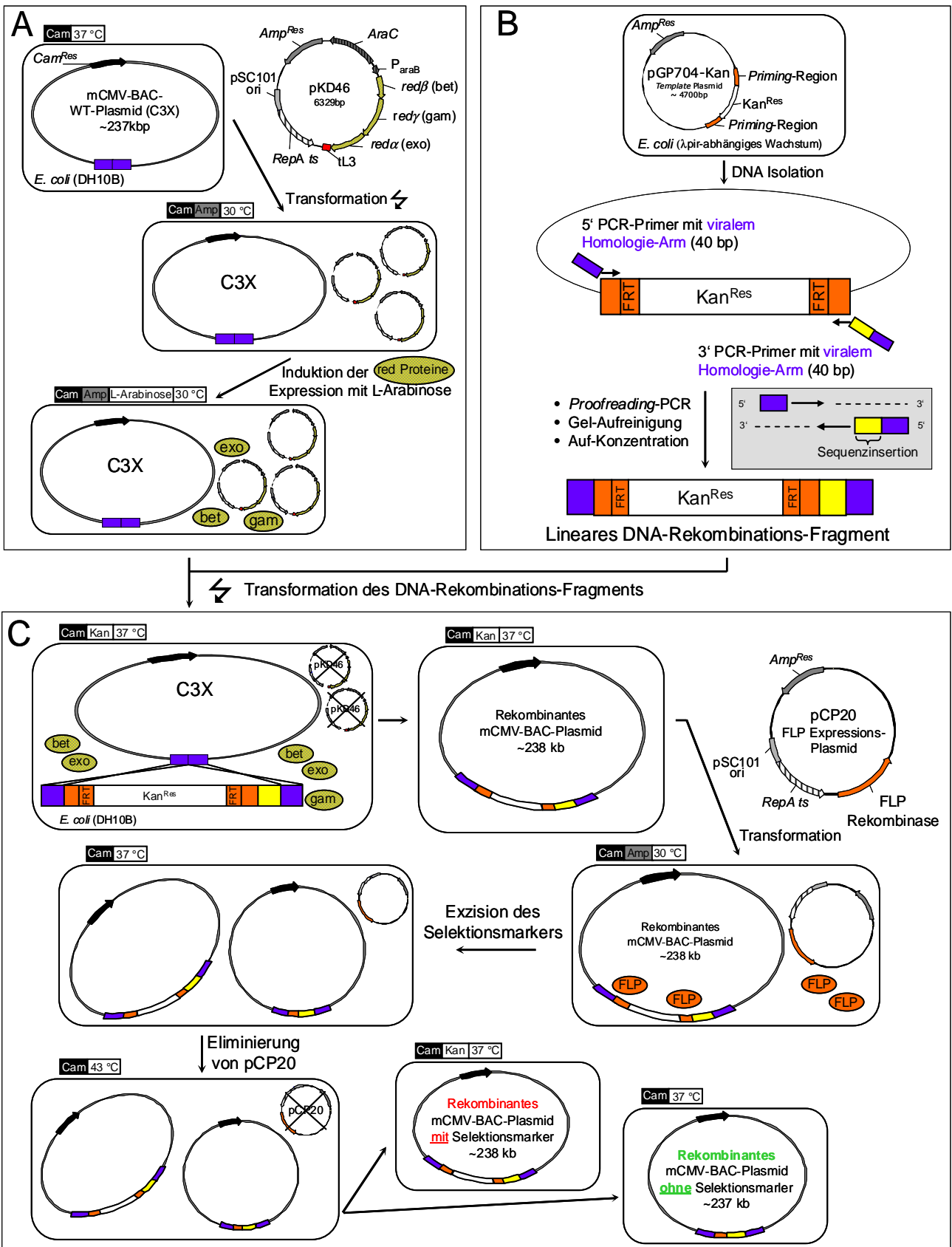


Abb. 3.33 Mutagenese-Prinzip von mCMV-BAC-Plasmiden mittels Ein-Schritt-Rekombinationsverfahren in *E. coli*. Der Ablauf ist exemplarisch für die Insertion einer DNA-Sequenz dargestellt. A: Transformation des Plasmids pKD46 (pKD46 exprimiert die für die Rekombination benötigten Red-Rekombinations-Proteine) in *E. coli*, die bereits das zu mutierende mCMV-BAC-WT-Plasmid enthalten. Im nächsten Schritt wird durch Zugabe von L-Arabinose und Inkubation bei 30°C die Expression der

Rekombinations-Proteine *exo*, *-bet* -und *-gam* (gelbschwarze Ellipse) induziert. Danach werden die Bakterien für die Elektrotransformation vorbereitet. B: Generierung und Präparation des linearen DNA-Rekombinations-Fragments. Das DNA-Rekombinations-Fragment wird über eine *Touch-down* PCR mit dem Plasmid pGP704-Kan als Matrizen-DNA hergestellt. Dieses beinhaltet das Kanamycin-Resistenzgen (*Kan^{Res}*, weiße Box) welches von zwei FRT-Erkennungssequenzen (orange Box), der Sequenzinsertion (gelbe Box) und von viralen DNA-Sequenzen (blaue Box) homolog zum mCMV-Genom flankiert wird. C: Mutagenese des C3X-Plasmids und Entfernung des Selektionsmarkers (*Kan^{Res}*). Elektrotransformation des linearen DNA-Rekombinations-Fragments in *E. coli*, die das C3X-Plasmid mit dem Chloramphenicol-Resistenzgen (*Cam^{Res}*) und die exprimierten Red-Rekombinations-Proteine *exo*, *-bet* und *-gam* enthalten. Durch ein Doppel-*Crossing-over* zwischen den homologen viralen Sequenzbereichen (blaue Box) kommt es zur Insertion des *Kan^{Res}* und der einzufügenden Sequenzinsertion (gelbe Box). Auf dieses Ereignis wird mit *Cam* und *Kan* gezielt selektioniert. Danach wird in *E. coli* mit dem mutierten mCMV-BAC-Plasmid das Plasmid pCP20 transformiert, so dass die FLP-Rekombinase (FLP, orange Ellipse) exprimiert werden kann. Die FLP vermittelt über die beiden FRT-Erkennungssequenzen das Herausschneiden des *Kan^{Res}*. Zur Identifikation von rekombinanten mCMV-BAC- Δ *Kan^{Res}*-Plasmiden werden Klone auf LB-Kan-Cam- bzw. LB-Cam-Platten ausplattiert.

3.10.1 HA-Epitop-Markierung des ORF*m164*-Proteins von mCMV

Ein vom MHC-Klasse-I-Molekül *D^d* präsentiertes Peptid der Sequenz 257-AGPPRYSRI-265 aus dem ORF*m164* ist das erste beschriebene Peptid, das in einer infizierten Zelle trotz der Gegenwart von Immunevasinen präsentiert wird und somit der Wirkung dieser Proteine konstitutiv entkommt (Holtappels et al., 2002a, c). Dieses immundominante Peptid wurde über Reverse Immunologie durch Epitop-Vorhersage-Algorithmen gefunden; über das zugehörige ORF*m164*-Protein war dagegen nichts bekannt (wahrscheinlich handelt es sich um ein Membran-Glykoprotein, Rawlinson et al., 1996). Zur Aufklärung der intrazellulären Lokalisation des ORF*m164*-Proteins sollten zwei Virusmutanten generiert werden, in denen das ORF*m164*-Protein C- bzw. N-terminal mit einem HA-Tag markiert ist. Dazu musste C-terminal das alte Stop- durch ein neues Stop-Codon, unter gleichzeitiger Insertion der HA-Epitop-Sequenz bzw. N-terminal das alte Start- durch ein neues Start-Codon, unter gleichzeitiger Insertion der HA-Epitop-Sequenz, ersetzt werden. Die Strategie zur Umsetzung dieser Insertionen ist in Abb. 3.34 dargestellt.

Für die Ein-Schritt-Rekombinationsmutagenese des C-Terminus von *m164* wurden die Oligonukleotide *m164-HA-FRT-rev_MM* und *m164-HA-FRT-for_MM* (siehe 2.8.1.2) verwendet. Das Oligonukleotid *m164-HA-FRT-rev_MM* enthielt neben den 40bp viralen Homologien (rechter Homologie-Arm, siehe Abb. 3.34AI, All) und der 20bp *Priming*-Region für das Plasmid pGP704-Kan (Plasmidkarte siehe Abb. 3.33B) zusätzlich die HA-Sequenz mit neuem Stop-Codon (siehe Abb. 3.34AII), die an das 3'-Ende des Gens *m164* fusioniert werden sollte. Mittels spezieller *Touch-down* PCR (siehe 2.11.2.2) und dem Plasmid pGP704-Kan als Matrizen-DNA wurde ein 1118bp DNA-Rekombinations-Fragment hergestellt, welches das *Kan^{Res}* flankiert von FRT-Sequenzen und viralen Homologien sowie 3' die HA-Sequenz besitzt (siehe Abb. 3.34AIII). Die N-terminale Fusion der HA-Epitop-Sequenz an das ORF*m164*-Protein erfolgte analog, allerdings unter der Verwendung des Oligonukleotid-Paars *m164-HA5'-FRT-rev_MM* und *m164-HA5'-FRT-for_MM* (siehe 2.8.1.2). Das Oligonukleotid *m164-HA5'-FRT-for_MM* enthielt entsprechend zu *m164-HA-FRT-rev_MM* 40bp virale Homologien (linker Homologie-Arm, siehe Abb. 3.34BI, BII),

20bp *Priming*-Region, sowie die HA-Sequenz jedoch mit neuem Start-Codon (siehe Abb. 3.34BII), die an das 5'-Ende des Gens *m164* fusioniert werden sollte.

Nach Durchführung der jeweiligen BAC-Mutagenese entstanden zunächst die mCMV-BAC-Plasmide mCMV-BAC-m164-Kan-3'HAtag (Abb. 3.34AIV) bzw. mCMV-BAC-m164-Kan-5'HAtag (Abb. 3.34BIV).

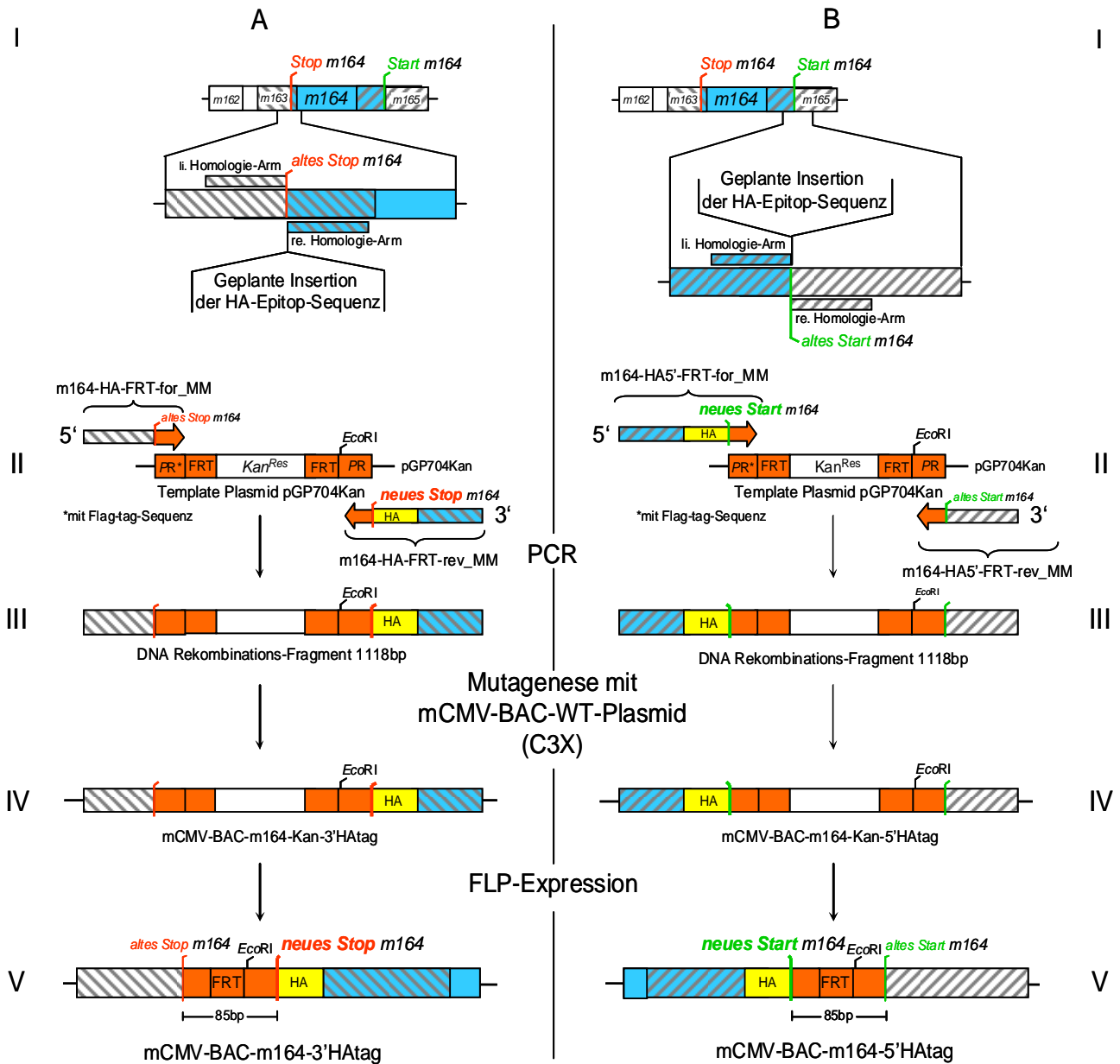


Abb. 3.34 Strategie zur Insertion einer HA-Epitop-Sequenz an das 3'- bzw. 5'-Ende des ORFs *m164*. A/BI: Schematische Darstellung der Genomregion mit den Genen *m162* (weiß), *m163* (grau schraffiert), *m164* (blau) und *m165* (grau schraffiert) im C3X-Plasmid. Der ORF *m164* überlappt im 3'-Bereich mit dem ORF *m163* (blaugrau schraffiert) und im 5'-Bereich mit dem ORF *m165* (blaugrau schraffiert). AI (C-terminale HA-Markierung): Die Vergrößerung der 3'-Genregion von *m164* zeigt die Position der geplanten HA-Epitop-Sequenz Insertion, sowie die Positionen der viralen Homologie-Arme. BI (N-terminale HA-Markierung): Analoge Vergrößerung der 5'-Genregion von *m164* mit der Position der geplanten HA-Epitop-Sequenz-Insertion sowie die Positionen der viralen Homologie-Arme. A/BII: Oligonukleotid-Design und PCR mit den dargestellten Oligonukleotid-Paaren sowie dem Plasmid pGP704-Kan als Matrize. Priming-Region (PR, orange), HA-Epitop-Sequenz (gelb), Kanamycin-Resistenzgen (Kan^{Res} , weiß). A/BIII: Das jeweils entstandene DNA-Rekombinations-Fragment trägt die entsprechenden linken viralen Homologien, die HA-Sequenz mit Stop- (AIII) bzw. Start-Codon (BIII), die nicht-kodierenden Priming-Regionen des Plasmids pGP704Kan und FRT-Sequenzen (orange), die jeweils das Kan^{Res} flankieren, sowie die rechte virale Homologie. A/BIV: Nach Durchführung der Mutagenese werden die zuvor beschriebenen DNA-Elemente in das C3X-Plasmid integriert. A/BV: Entfernung der Kan^{Res} -Kassetten durch FLP-Rekombinase führt zu den mCMV-BAC-Plasmiden mit der fusionierten HA-Epitop-Sequenz am 3'- (mCMV-BAC-m164-3'HAtag, AV) bzw. am 5'-Ende (mCMV-BAC-m164-5'HAtag, BV) des ORFs *m164*. Ein Sequenzbereich (insgesamt 85bp) als Spur der Mutagenese, bestehend aus den beiden Priming-Regionen und einer FRT-Sequenz, bleibt dauerhaft zurück.

3.10.1.1 Entfernung des Selektionsmarkers nach der Mutagenese

Das Ein-Schritt-Rekombinationsverfahren erfordert analog dem Zwei-Schritt-Rekombinationsverfahren grundsätzlich die Insertion eines Resistenzgens (hier Kan^{Res}) an die Position der deletierten bzw. inserierten Sequenz. Um nach der Mutagenese die verbleibenden nicht-viralen DNA-Sequenzen so klein wie möglich zu halten, muss das Resistenzgen wieder entfernt werden können. Deshalb wurde dieses mit FRT-Erkennungssequenzen flankiert, die von der FLP-Rekombinase (McLeod et al., 1986) erkannt werden. FLP führt zur Rekombination zwischen zwei gleich orientierten FRT-Erkennungssequenzen und dadurch zur Exzision von DNA-Sequenzen, die zwischen zwei FRT-Sequenzen liegen. Im rekombinanten Plasmid bleibt allerdings eine einzige FRT-Erkennungssequenz zurück.

Zunächst musste die DNA-Qualität für beide rekombinanten Plasmide mCMV-BAC-m164-Kan-3'HAtag sowie mCMV-BAC-m164-Kan-5'HAtag überprüft werden. Dazu wurde die DNA von jeweils 8 bis 10 Klonen isoliert und nach Kontrollrestriktion mit *EcoRI* im Agarose-Gel aufgetrennt (siehe Abb. 3.35). Die Analyse der BAC-Klone erwies sich als essentiell, da regelmäßig Klone identifiziert werden konnten, die Reste des Expressions-Plasmids pKD46 sowie Instabilitäten im mCMV-BAC-Genom aufwiesen (in Abb. 3.35 durch Pfeile markiert).

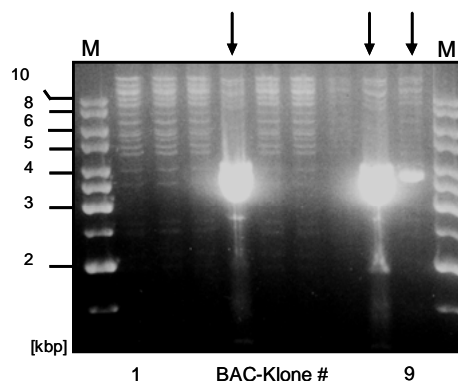


Abb. 3.35 Kontrollrestriktion mit *EcoRI* nach Insertion der Kan^{Res} . Zur Überprüfung der BAC-DNA-Qualität wurde BAC-Minipräparations-DNA ausgewählter Klone von mCMV-BAC-m164-Kan-3'HAtag und mCMV-BAC-m164-Kan-5'HAtag (Daten nicht gezeigt) mit *EcoRI* verdaut und die entstandenen Fragmente wurden in einem 0,6%igem Agarose-Gel aufgetrennt. Die mit Pfeilen gekennzeichneten Spuren zeigen instabile mCMV-BAC-Genome und Reste des Plasmids pKD46. Spur: M, 1kbp Marker.

Zur Entfernung der Kan^{Res} -Kassetten durch FLP aus mCMV-BAC-m164-Kan-3'HAtag bzw. mCMV-BAC-m164-Kan-5'HAtag wurde je ein bakterieller Klon mit stabilem mCMV-BAC-Genom ausgewählt, mit dem Plasmid pCP20 (Plasmidkarte siehe Abb. 3.33C) transformiert und dadurch die Expression von FLP ermöglicht. Durch Expression der FLP-Rekombinase konnte die jeweilige Kan^{Res} mittels zielgerichteter Rekombination entfernt werden. Somit wurden die rekombinanten mCMV-BAC-Plasmide mCMV-BAC-m164-3'HAtag und mCMV-BAC-m164-5'HAtag (siehe Abb. 3.34A/BV) generiert. Nach Exzision des Kan^{Res} bleiben außer der inserierten HA-Epitop-Sequenz insgesamt 85bp nicht entfernbare Fremd-Sequenzen im viralen Genom erhalten (siehe Abb.3.34A/BV).

Schlussfolgerung: Das auf linearen PCR-Fragmenten beruhende Ein-Schritt-Rekombinationsverfahren zur Mutagenese von mCMV-BAC-Plasmiden nach Wagner & Koszinowski (2004) konnte erfolgreich in der Arbeitsgruppe etabliert werden. Damit war es möglich, den ORF *m164* sowohl am 3'- als auch am 5'-Ende mit einer HA-Epitop-Sequenz zu markieren.

3.10.2 Charakterisierung der HA-markierten rekombinanten mCMV-BAC-Plasmide

Zur Überprüfung der korrekten HA-Epitop-Sequenz Insertion am 3'- bzw. 5'-Ende des Gens *m164* musste eine strukturelle Genom-Analyse der rekombinanten Plasmide mCMV-BAC-m164-3'HAtag und mCMV-BAC-m164-5'HAtag durchgeführt werden. Dazu wurde die jeweilige BAC-Maxipräparations-DNA mit *EcoRI* verdaut und anschließend Gel-elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Southern-Blotting wurde die Membran mit einer *m164* spezifischen Oligonukleotid-Sonde (m164-Sonde, siehe 2.8.1.2) hybridisiert (für die Position der Sonde, siehe Abb. 3.36A). Die nach *EcoRI* Restriktion zu erwartenden DNA-Fragmente sind in den Karten der jeweiligen Rekombinanten eingezeichnet (siehe Abb. 3.36A). Das Ergebnis der strukturellen Southern-Blot-Genom-Analyse ist in Abb.3.36B gezeigt.

Im C3X-Plasmid besitzt das *m164* Gen-enthaltende *EcoRI* Fragment eine Länge von 22,8kbp. Die erfolgreiche Insertion der HA-Epitop-Sequenz am 3'- bzw. 5'-Ende des Gens *m164* führte durch eine zusätzlich vorhandene *EcoRI*-Restriktionsenzymstichstelle zu jeweils zwei neuen Banden, bei 3'HA zu 4,4 und 18,4 bzw. bei 5'HA zu 5,8 und 17kbp. Da nach *EcoRI* Restriktion 36 (C3X) bzw. 37 (Rekombinanten) Fragmente entstehen, ist es äußerst schwierig, einzelne Banden im Ethidiumbromid-gefärbten Agarose-Gel eindeutig zu diskriminieren. Die korrekte Insertion der HA-Epitop-Sequenzen konnte jedoch indirekt im Southern-Blot durch den Nachweis von *m164* eindeutig bestätigt werden. Nach *EcoRI* Restriktion von C3X-, mCMV-BAC-m164-3'HAtag- bzw. mCMV-BAC-m164-5'HAtag-Plasmid-DNA konnte mit der *m164* spezifischen Oligonukleotid-Sonde tatsächlich die zu erwartenden 22,8kbp, 18,4kbp bzw. 5,8kbp Fragmente (siehe Abb. 3.36B) eindeutig nachgewiesen werden. Somit ist die korrekte Integration der HA-Epitop-Sequenzen verifiziert.

Zur weiteren Charakterisierung wurde BAC-Maxipräparations-DNA der Plasmide mCMV-BAC-m164-3'HAtag bzw. mCMV-BAC-m164-5'HAtag mit den Oligonukleotiden m164-seq-3'HAfor/m164-seq-3'HArev bzw. BACm164HANm165for/BACm164HANm164rev (siehe 2.8.1.1) sequenziert. Dadurch konnte die Nukleotid-genaue Fusion der HA-Sequenz an das 3'- bzw. 5-Ende des ORFs *m164* bei gleichzeitiger Deletion des ursprünglichen Stop- bzw. Start-Codons auch auf molekularer Ebene klar bestätigt werden (Sequenzier-Ergebnisse siehe Anhang 6.5).

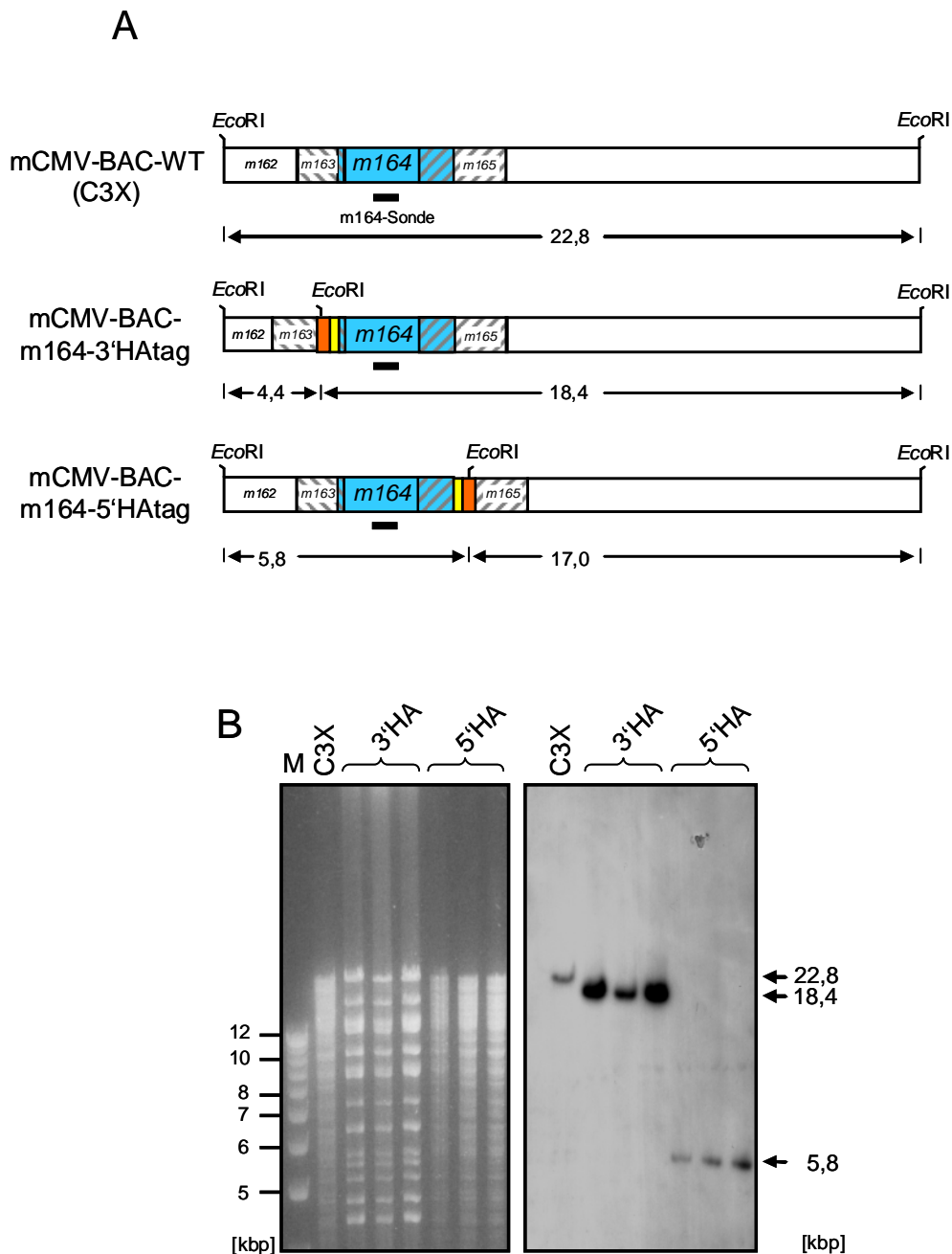


Abb. 3.36 Analyse rekombinanter mCMV-BAC-Plasmide. A: Schematische Darstellung der Genomregion, mit den Genen *m162* (weiß), *m163* (grau schraffiert), *m164* (blau) und *m165* (grau schraffiert) im mCMV-BAC-Plasmid. Der ORF *m164* überlappt im 3'-Bereich mit dem ORF *m163* (blaugrau schraffiert) und im 5'-Bereich mit dem ORF *m165* (blaugrau schraffiert). Nach Fusion der HA-Epitop-Sequenz (gelb) an das 3'- bzw. 5'-Ende des Gens *m164* und den nicht entfernbaren Fremd-Sequenzen (orange) verändert sich das *EcoRI*-Restriktionsenzymmuster durch die zusätzliche *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle in den nicht entfernbaren Fremd-Sequenzen. Statt der 22,8kbp *EcoRI*-Bande in C3X entstehen in den Rekombinanten jeweils zwei neue Banden. Die zu erwarteten Fragmentgrößen nach *EcoRI*-Restriktion sind in die jeweilige Karte der mCMV-BAC-Plasmide eingezeichnet. Die Position der *m164*-spezifischen Oligonukleotid-Sonde (m164-Sonde) im mCMV-Genom ist durch einen schwarzen horizontalen Balken symbolisiert. B: Indirekter Nachweis der korrekten Integration der HA-Epitop-Sequenzen in das mCMV-BAC-Genom nach *EcoRI*-Restriktion der jeweiligen BAC-DNA. Auftrennung der DNA im Agarose-Gel (links), gefolgt von Southern-Blot (rechts) und Hybridisierung mit einer *m164*-spezifischen m164-Sonde. M, 1kbp Marker; C3X, mCMV-BAC-WT; 3'HA, mCMV-BAC-m164-3'HAtag; 5'HA, mCMV-BAC-m164-5'HAtag

Nach Transfektion der Plasmide mCMV-BAC-m164-3'HAtag bzw. mCMV-BAC-m164-5'HAtag in MEF (siehe 2.4.4.1) wurden die rekombinanten mCMV-m164-3'HA bzw. mCMV-m164-5'HA rekonstituiert. Die Eliminierung der bakteriellen-Sequenzen (BAC-Sequenz) durch wiederholtes Passagieren auf MEF (siehe 2.7.3) wurde bisher nur für die Mutante mCMV-BAC-m164-3'HAtag durchgeführt. Von der BAC-freien Virus-Mutante mCMV-m164-3'HA wurde für zukünftige Experimente ein über Dichtegradienten-Ultrazentrifugation gereinigter Virusstock ($5,7 \times 10^8$ PFU/ml) hergestellt sowie das Genom-zu-PFU-Verhältnis (vgl. Kapitel 3.6; MW1 915, MW2 851, MW3 924 [Genome/PFU]) bestimmt.

Schlussfolgerung:

1. Die erfolgreiche Integration einer HA-Epitop-Sequenz mittels Ein-Schritt-Rekombinationsmutagenese am 3'- bzw. 5'-Ende des Gens *m164* konnte durch strukturelle Genom-Analyse und Sequenzierung eindeutig verifiziert werden.
2. Nach Transfektion der HA-markierten BAC-Plasmide in MEF wurden erfolgreich rekombinante Viren rekonstituiert.

4 Diskussion

4.1 Interpretation der Ergebnisse

Rekurrente Infektion als Folge der Reaktivierung von latentem Cytomegalovirus (CMV) ist eine lebensbedrohende Komplikation in hämatoablativ therapierten Empfängern einer Knochenmarktransplantation (KMT), wobei Interstitielle Pneumonie und Hepatitis wesentliche Manifestationen der CMV-Erkrankung darstellen. Daher sind viele Untersuchungen, insbesondere von unserer Arbeitsgruppe, durchgeführt worden, die sich mit der Aufklärung der molekularen Mechanismen von CMV-Latenz und Reaktivierung befassen.

Die Untersuchungen zur CMV-Latenz und Reaktivierung erfolgen im BALB/c Modellsystem der murinen CMV (mCMV)-Infektion nach experimenteller KMT. Die Kontrolle der produktiven Infektion ist in diesem kliniknahen Modell von der effizienten Rekonstitution antiviraler CD8 T-Zellen abhängig (Holtappels et al., 1998; Holtappels et al., 2000c; Podlech et al., 2000, zur Übersicht siehe Holtappels et al., 2005). Die Beendigung der Virus-Replikation in den Organen, z. B. in der Lunge, einem Hauptort von CMV-Pathogenese, führt jedoch nicht zur Elimination des viralen Genoms. Dieses verbleibt vielmehr in einem Zustand der Latenz, aus dem heraus eine Reaktivierung des produktiven Replikationszyklus erfolgen kann.

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass nur ein geringer Anteil latenter mCMV-Genome in der Lunge die *Major Immediate Early* (MIE) Gene *ie1* und *ie2* exprimiert, die Latenz aber dennoch bestehen bleibt, da das differentielle *Splicing* des primären IE1/3 Transkripts zum Transaktivator-Transkript IE3 nicht erfolgt und folglich weder E-Proteine noch infektiöses Virus gebildet werden (Kurz et al., 1997; Kurz et al., 1999; Kurz & Reddehase 1999; Grzimek et al., 2001; zur Übersicht siehe Reddehase et al., 2002).

Parallel zur Latenz-assoziierten IE1-Genexpression konnte in der latent infizierten Lunge eine Anreicherung aktivierter CD62L-low CD8 T-Zellen mit Spezifität für das immundominante IE1-Peptid 168-YPHFMPTNL-176 nachgewiesen werden (Holtappels et al., 2000c). Eine Kopplung der molekularen Daten mit den immunologischen Daten führt zu folgender Hypothese:

IE1-Peptid-spezifische CD8 T-Zellen erkennen latent infizierte Zellen in der ersten Stufe transkriptioneller Reaktivierung (zur Verdeutlichung in Abb. 4.1 illustriert).

Es werden sporadisch zu jedem Zeitpunkt der Latenz in der Lunge selektiv IE1-Transkripte gebildet und IE1-Peptide auf der Zelloberfläche präsentiert. Die Erkennung des spezifischen Antigens durch IE1-Peptid-spezifische Memory CD8 T-Zellen stimuliert diese zur Proliferation, was zu einer klonalen Anreicherung der Effektor-Zellen führt. IE1-Peptid-spezifische Effektor-Zellen verhindern die CMV-Reaktivierung im *immediate early* Stadium, indem sie IE1-Peptid präsentierende Zellen lysieren. Zur Evaluierung der Hypothese wurde mittels BAC-Mutagenese ein rekombinantes mCMV (mCMV-IE1-L176A) generiert, in welchem das IE1-Peptid durch Punktmutation der C-terminalen MHC-Ankeramino-säure L176A zerstört ist.

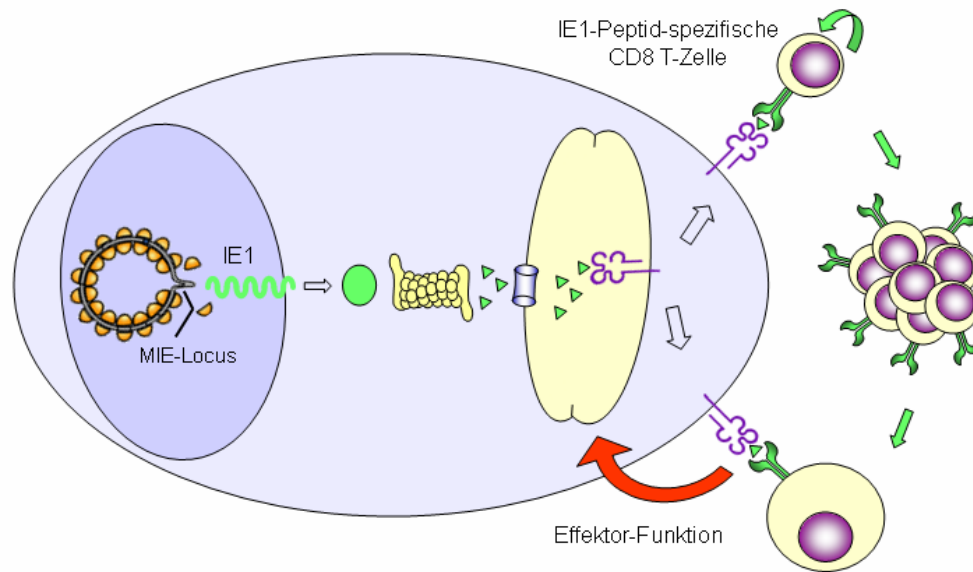


Abb. 4.1 Modell: IE1-Peptid-spezifische CD8 T-Zellen erkennen latently infizierte Zellen in der ersten Stufe transkriptioneller Reaktivierung (aus Simon et al., 2005b).

Generierung rekombinanter Viren: Von der Insertionsmutagenese bis zur BAC-Technologie

Generell spielt die moderne Molekularbiologie bei der Herstellung von Virusmutanten eine zentrale Rolle. Virale Genome werden als Plasmide in *E. coli* kloniert und können dann mit etablierten molekularbiologischen Methoden (Sambrook & Russel, 2001) verändert, amplifiziert und charakterisiert werden. Nach erfolgreicher Mutagenese erfolgt zur Rekonstitution von Virusmutanten die Transfektion der viralen Genome in eukaryotische Zellen. Dieses Prinzip wird seit Jahren zur Mutagenese verschiedenster Viren mit Genomen bis zu einer Größe von ca. 35kbp erfolgreich angewendet (z. B. HBV; Bichko et al., 1982; Adenovirus; Chartier et al., 1996). Bei der Mutagenese von Viren mit sehr großen viralen DNA-Sequenzen (>100kbp) konnte dagegen dieses Prinzip aufgrund von Plasmid-Instabilitäten in *E. coli* nicht erfolgreich angewandt werden.

Als Alternative wurde die Klonierung viraler Genome als *Yeast Artificial Chromosomes* (YACs) in Hefen (Ramsay, 1994) versucht und z. B. für das 35kbp große Adenovirusgenom beschrieben (Ketner et al., 1994). Allerdings kam es in Folge der starken Rekombinationsaktivität in Hefen zu spontanen *Rearrangements* und damit zu Instabilitäten der inserierten Sequenzen (Ramsay, 1994; Schalkwyk et al., 1995). Aus diesem Grund wurde bisher die Mutagenese der CMV-Genome nicht in Hefen, sondern in Säugerzellen durchgeführt.

Die dabei am häufigsten verwendete Methode ist die Insertionsmutagenese durch homologe Rekombination in Zellen (Spaete & Mocarski, 1987; Manning & Mocarski, 1988). Wegen der langsamen Replikationsgeschwindigkeit der CMV, der geringen Rekombinationshäufigkeit in eukaryotischen Zellen und der Instabilität der viralen Genome aufgrund direkter und invertierter

Sequenz-Wiederholungen, die zu illegitimen Rekombinationsereignissen führen können, ist diese Mutagenese-Technik fehlerhaft und zeitaufwendig (Spaete & Mocarski, 1987; Vieira et al., 1994). Ein weiteres Problem dieser Methode stellt die Notwendigkeit der Selektion auf rekombinante Viren und ihre Abtrennung von WT-Viren dar, besonders wenn das rekombinante Virus einen Wachstumsnachteil aufweist. Dies wurde teilweise durch die Verwendung von Selektionsgenen, wie z. B. *neo*, *gpt* oder *puro*, verbessert (Wolff et al., 1993; Greaves et al., 1995; Abbate et al., 2001), konnte aber dennoch die Limitationen dieser Methode nicht überwinden.

Einen weiteren Fortschritt für die CMV-Mutagenese stellt die Verwendung von Cosmiden mit subklonierten viralen Sequenzen mit einer Größe von 10 bis 35kbp dar (Kemble et al., 1996; Mocarski & Kemble, 1996). Die Mutation kann in *E. coli* in das virale Cosmid eingeführt werden und rekombinantes Virus kann dann durch Cotransfektion aller viralen Cosmide in permissive Zellen rekonstituiert werden. So muss nicht mehr gegen WT-Viren selektioniert werden. Der große Nachteil dieser Technik für eine erfolgreiche Virusrekonstitution ist die Notwendigkeit des gleichzeitigen Stattfindens von mindestens 8 spezifischen Rekombinationsereignissen zwischen den einzelnen Cosmiden in den Zellen. Diese können zu illegitimen Rekombinationen führen und sind außerdem ineffizient (Kemble et al., 1996). Die Überprüfung einer korrekten Genomstruktur kann zudem erst nach vollendeter Mutagenese erfolgen. Dieses Verfahren konnte sich deshalb nicht durchsetzen.

Um die langwierige Herstellung von CMV-Mutanten in eukaryotischen Zellen zu umgehen und die Vorteile der Bakteriengenetik in *E. coli* doch für die CMV-Mutagenese zu verwenden, wählten Messerle et al., 1997 einen neuen Weg. Zur stabilen Propagierung der sehr großen viralen DNA-Genome wurden keine klassischen *high-copy* Plasmide verwendet, sondern BAC-Plasmide. Diese basieren auf dem Replikon des bakteriellen f-Plasmids. Pro Bakterium sind nur ein bis zwei Kopien vorhanden und erlauben somit eine stabile Vermehrung von bis zu 300kbp-langen DNA-Sequenzen in *E. coli* (Shizuya et al., 1992, siehe auch 1.6). Damit konnte das mCMV-Genom in ein BAC kloniert und in *E. coli* überführt werden. Dort kann es mutagenisiert, charakterisiert und anschließend zur Rekonstitution von Virusmutanten wieder in permissive Zellen transfiziert werden (Messerle et al., 1997; siehe auch 1.6). Die Methode konnte in den letzten Jahren noch weiter verbessert werden (Borst et al., 1999, 2004; Wagner et al., 1999; zur Übersicht siehe Brune et al., 2005), und wurde mittlerweile zur Klonierung und Mutagenese einer Vielzahl von Herpesviren, wie z. B. EBV, HSV, PRV, HCMV und MHV-68 angewandt (Delecluse et al., 1998; Stavropoulos & Strathdee, 1998; Saeki et al., 1998; Smith & Enquist 1999; Borst et a., 1999; Adler et al., 2001). Dies unterstreicht die generelle Anwendbarkeit der BAC-Technologie für große DNA-Viren. Die BAC-Mutagenese hat im Vergleich zur Mutagenese in Zellkultur folgende Vorteile:

1. Die zur Mutagenese notwendigen Manipulationen im BAC-Genom werden alle in *E. coli* durchgeführt.
2. Die Bestätigung einer korrekten Mutagenese und die Charakterisierung der Integrität der Genomstruktur werden vor der Virusrekonstitution durchgeführt.

3. Die Mutagenese unterliegt nicht den kaum kontrollierbaren Rekombinationsmechanismen in eukaryotischen Zellen.
4. Nach Transfektion des mutierten BAC-Genoms wird nur das rekombinante Virus rekonstituiert, eine Selektion gegen WT-Virus ist nicht mehr notwendig.

Da die Herstellung von rekombinanten Viren in der Arbeitsgruppe bisher nur durch Insertionsmutagenese (Grzimek et al., 1999) erfolgte, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Technik der mCMV-BAC-Mutagenese im Zwei-Schritt-Rekombinationsverfahren in Anlehnung an die Arbeiten von Messerle et al., 1997; Borst et al., 1999, 2004; und Wagner et al., 1999, in der Arbeitsgruppe etabliert und damit erstmals Punktmutationen in das mCMV-BAC-Genom inseriert.

Generierung von mCMV-Rekombinanten mit Punktmutationen im MHC-Anker Codon

Um die Auswirkung einer fehlenden Antigenpräsentation des IE1-Peptids 168-YPHFMPTNL-176 auf die Latenz-assoziierte IE1-Genexpression zu untersuchen, wurde die Mutante mCMV-IE1-L176A generiert, in der die Präsentation des IE1-Peptids durch die Punktmutation L176A der C-terminalen Ankeraminosäure ausgeschaltet ist. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass ein Austausch L176A die Bindung an das MHC-Klasse-I-Molekül (L^d) um 6 Log_{10} -Stufen reduziert (Reddehase & Koszinowski, 1991; Rognan et al., 1992). Für den Unterschied in der Antigenität zwischen 168-YPHFMPTNA-176 und 168-YPHFMPTNL-176 könnte der Isopropyl-Rest am β C-Atom von L176 verantwortlich sein. Hingegen trägt A176 an gleicher Position eine Methyl-Gruppe; diese besitzt im Vergleich zur Isopropyl-Gruppe wesentlich schwächere hydrophobe Bindungseigenschaften, sodass keine effiziente Bindung von 168-YPHFMPTNA-176 an das L^d -Molekül erfolgt (Reddehase & Kalbacher, 1989). Zudem entsteht das IE1-A Analogon nicht durch proteasomale Prozessierung (P.-M. Kloetzel, Charite, Berlin). Die Mutation der durch proteasomalen Schnitt festgelegten C-terminalen MHC-Ankerposition ist, wie Arbeiten in anderen Systemen bereits gezeigt haben, die sicherste Methode zur Verhinderung der Peptidpräsentation (Matloubian et al., 1990; Moskophidis et al., 1995; Busch et al., 1999). Der Antigenitätsverlust ist damit doppelt abgesichert. So führt der Austausch von nur zwei Nukleotiden CT \rightarrow GC im viralen Genom zur Modulation der Antigenität des Virus. Verglichen mit anderen funktional-deletären Austauschen (L176N, L176W) (Reddehase & Koszinowski, 1991; Rognan et al., 1992), die auch zu einer deutlichen Reduktion der Bindung an das L^d -Molekül führen, sollte der Austausch L176A den geringsten Einfluss auf die Funktionalität des IE1-Proteins haben, da die Aminosäuren Leu und Ala ähnliche chemische und strukturelle Eigenschaften aufweisen und sich nur durch die Länge ihrer hydrophoben Seitenkette am β C-Atom unterscheiden (s. o.; Taylor, 1986). Trotzdem kann auch dieser konservative Austausch die Funktionalität des Proteins und damit die Biologie des Virus verändern. Dennoch war dies zumindest die minimalste denkbare Änderung, die den gewünschten immunologischen Phänotyp, also den Verlust der IE1-Antigenität, herbeiführte. Es ist wichtig zu betonen, dass das IE1-Protein kein weiteres antigenes CD8 T-

Zellepitop im H-2^d Haplotyp enthält (unpublizierte Arbeiten von R. Holtappels, Institut für Virologie, Mainz).

Zur Kontrolle wurden drei Revertanten generiert: mCMV-IE1-A176F, mCMV-IE1-A176L und mCMV-IE1-A176L*. In letzterer, als *Wobble*-Revertante bezeichnet, wurde wieder die authentische MHC-Klasse-I Ankeramino-säure L176 eingesetzt, es verblieb aber ein singulärer Nukleotidaustausch A→T in der *Wobble*-Position des Codons als Marker zur Unterscheidung zum WT-Virus. In der Revertante mCMV-IE1-A176F wurde eine Mutation A176F durchgeführt. Das F176-Analogon des IE1-Peptids bindet mindestens mit gleicher Effizienz an das L^d-Molekül wie das authentische IE1-Peptid (Reddehase & Koszinowski, 1991; Rognan et al., 1992). In einem *in vitro* Proteasomen Assay konnte zudem gezeigt werden, dass ein 25-meres IE1-Substrat mit F in der C-terminalen MHC-Ankerposition mit einer dem L-Originalpeptid vergleichbaren Effizienz prozessiert wird (Persönliche Mitteilung P.-M. Kloetzel & U. Kuckelkorn, Charite, Berlin).

Zur Herstellung der mCMV-Rekombinanten mit Punktmutationen im MHC-Anker Codon wurde das Zwei-Schritt-Rekombinationsverfahren (Messerle et al., 1997; Borst et al., 1999, 2004; Wagner et al., 1999) verwendet. Dazu mussten zuerst in relativ zeitaufwendigen Klonierungsschritten die für die Zwei-Schritt-Rekombinationsmutagenese benötigten *Shuttle*-Plasmide mit den entsprechenden Punktmutationen kloniert werden. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Mutation von etwa 2-3kbp-langen, zum Virusgenom homologen Sequenzen, flankiert wurde (Smith, G. R., 1988), um eine RecA-vermittelte homologe Rekombination zwischen dem jeweiligen *Shuttle*-Plasmid und dem mCMV-BAC-Plasmid zu ermöglichen. Für die Klonierung der IE1-*Shuttle*-Plasmide konnte auf das bereits vorhandene Plasmid pUCAMB (Grzimek et al., 2001) zurückgegriffen werden. Dieses Plasmid enthält neben der DNA-Sequenz des IE1-Peptids hinreichend lange flankierende virale DNA-Sequenzen. Zudem zeichnet sich diese mCMV-Genregion durch das Vorhandensein klonierungs-relevanter Restriktionsenzym-Schnittstellen aus, so dass eine Subklonierung der für eine effiziente homologe Rekombination benötigten viralen DNA-Sequenzen realisierbar war. Die Mutante mCMV-BAC-IE1-L176A sowie die drei Revertanten mCMV-BAC-IE1-A176L, mCMV-BAC-IE1-A176L* und mCMV-BAC-IE1-A176F stellen das erfolgreiche Ergebnis homologer Rekombination zwischen dem entsprechenden *Shuttle*-Plasmid und dem zu mutierenden mCMV-BAC-Plasmid dar. Zur Generierung von mCMV-BAC-IE1-L176A wurde das mCMV-BAC-WT-Plasmid C3X (Wagner et al., 1999) verwendet. Hingegen erfolgte die Generierung der drei Revertanten ausgehend von der Mutante mCMV-BAC-IE1-L176A. Nach Transfektion der rekombinanten mCMV-BAC-Plasmide in permissive Zellen konnten die entsprechenden Viren nach erfolgreicher Rekonstitution aus dem Zellkultur-Überstand isoliert und gereinigt werden.

Neben dem IE1-Peptid wurde ein zweites immundominantes Peptid von mCMV, ein D^d-restringiertes Peptid 257-AGPPRYSRI-265 aus dem E-Phase Protein pORF_{m164} identifiziert, das eine zum IE1-Peptid vergleichbar hohe Frequenz an antiviralen CD8 T-Zellen induziert (Holtappels

et al., 2002a). Es konnte gezeigt werden, dass während der Latenz nahezu 80% aller *Memory* CD8 T-Zellen im Haplotyp *H-2^d* gegen die Peptide IE1 und m164 gerichtet sind. Da das antigene ORFm164-Peptid über „Reverse Immunologie“ aus der genomischen mCMV-Sequenz identifiziert wurde, war über das m164-Protein zum Zeitpunkt der Arbeiten noch nichts bekannt. Auch Genexpressionsstudien während der Latenz wurden für *m164* bisher noch nicht durchgeführt, so dass derzeit nicht bekannt ist, ob für das Gen *m164* ein zum *ie1* vergleichbares Latenz-assoziiertes Expressionsmuster existiert. Zur Klärung der Rolle dieses zweiten immundominanten mCMV-Peptids wurde, mit analoger Strategie zu IE1, durch die Mutation I265A die Präsentation verhindert. In der korrespondierenden Revertante A265I ist die Präsentation des m164-Peptids wieder möglich. Zusätzlich erfolgte die Herstellung einer Doppelmutante, in der beide immundominanten Peptide von mCMV funktionell inaktiviert wurden, sowie die zugehörige Revertante, in der die Präsentation der immundominanten Peptide wieder möglich ist.

Mit dem bereits etablierten Modell nach experimenteller KMT und Infektion mit den generierten MHC-Anker-Mutanten kann neben der Analyse der Latenz-assoziierten Genexpression auch eine Immunomanalyse nach gezielter Modulation des CD8 T-Zell-Immuns erfolgen. Besonders interessant wird dabei der Wegfall der beiden immundominanten Peptide und damit der entsprechenden CD8 T-Zellen aus dem reagierenden Repertoire sein. Es kann folgende Arbeitshypothese formuliert werden:

Wenn beide dominanten Peptide durch Mutation ausgeschaltet sind, kommt es zur Etablierung einer persistierenden Infektion in der Lunge, während der Ausfall nur eines der beiden Peptide vom jeweils anderen kompensiert werden könnte. Alternativ könnte der Ausfall beider dominanten Peptide aber auch zu einer Adaptation des Immunoms führen, dergestalt, dass bislang subdominante Spezifitäten die Funktion übernehmen.

C3X ist eine Chimäre im *HindIII* E Bereich

Im Gegensatz zur Klonierung der IE1-*Shuttle*-Plasmide erwies sich die Klonierung der m164-*Shuttle*-Plasmide als deutlich komplexer. Dafür existieren mehrere Gründe:

1. Die von Ebeling et al. (1983) erstellte *HindIII*-Plasmid-Bank für den auch von uns verwendeten mCMV-Stamm Smith (WT-mCMV; ATTC VR-1399) war unvollständig hinsichtlich des rechten terminalen *HindIII*-E-Fragments, auf dem sich auch der ORF *m164* befindet. Das *HindIII*-E-Fragment konnte von Ebeling und Kollegen nicht kloniert werden.
2. Mercer et al. (1983) gelang dagegen die Klonierung einer vollständigen *HindIII*-Plasmid-Bank inklusive des mit *HindIII*-E' bezeichneten terminalen DNA-Fragments. Für die Konstruktion dieser *HindIII*-Bank wurde jedoch der mCMV-Stamm K181 verwendet. Die mCMV-Stämme Smith und K181 weisen jedoch in infizierten Tieren einen unterschiedlichen Phänotyp auf (Hudson, 1979; Hudson et al., 1988). Die Suche genotypischer Unterschiede zwischen den beiden mCMV-Stämmen war bisher kaum

Grundlage intensiver molekularer Studien. Rawlinson et al. (1996) analysierte die komplette mCMV-Sequenz des Stammes Smith und stellte bei bereits publizierten Genen des K181 und WT-mCMV (wie *m133*, *M55* und *M75*) nur geringe Unterschiede in der DNA-Sequenz fest. Dennoch konnten für den ORF *m04* sowohl auf DNA- als auch auf Protein-Ebene deutliche Unterschiede zwischen WT-mCMV und K181 festgestellt werden (Morello et al., 2002). Damit kann nicht ausgeschlossen werden, dass weitere Unterschiede zwischen diesen beiden mCMV-Stämmen, auch für andere Genregionen, existieren. Die Verwendung des *HindIII*-E'-Fragments zur Subklonierung der benötigten DNA-Sequenzen wäre somit nicht zweckmäßig gewesen.

- Als Basis für die Konstruktion des primären mCMV-BAC-WT-Plasmids (Messerle et al., 1997) diente WT-mCMV Smith. Zur Insertion der BAC-Vektor-Sequenz wurde am rechten terminalen *HindIII*-E-Ende eine 8kbp große Sequenz deletiert, die sich in einem nicht essentiellen Sequenzbereich (Thäle et al., 1995) befindet. Die Insertion der BAC-Vektor-Sequenz in das mCMV-Genom erfolgte durch homologe Rekombination; die dafür benötigten homologen viralen Sequenzen mussten aus dem *HindIII*-E'-Fragment (K181) subkloniert werden. Das rekonstituierte Virus MC96.73 (Messerle et al., 1997) war *in vivo* attenuiert (Wagner et al., 1999). Aus diesem Grund wurden die zuvor inserierten nicht-viralen-Sequenzen deletiert und die fehlenden mCMV-Sequenzen aus dem *HindIII*-E'-Fragment re-inseriert (Wagner et al., 1999). Das entstandene mCMV-BAC-WT-Plasmid (C3X) beinhaltet somit eine chimäre mCMV-Sequenz im *HindIII*-E-Bereich (siehe Abb. 4.2). Die vom mCMV-Stamm K181 re-inserierte virale Sequenz umfasst einen 17,021kbp großen Bereich von Nukleotidposition 207.530 bis 224.550 (Sequenzangabe nach Rawlinson et al., 1996). Darin ist auch der ORF *m164* enthalten.

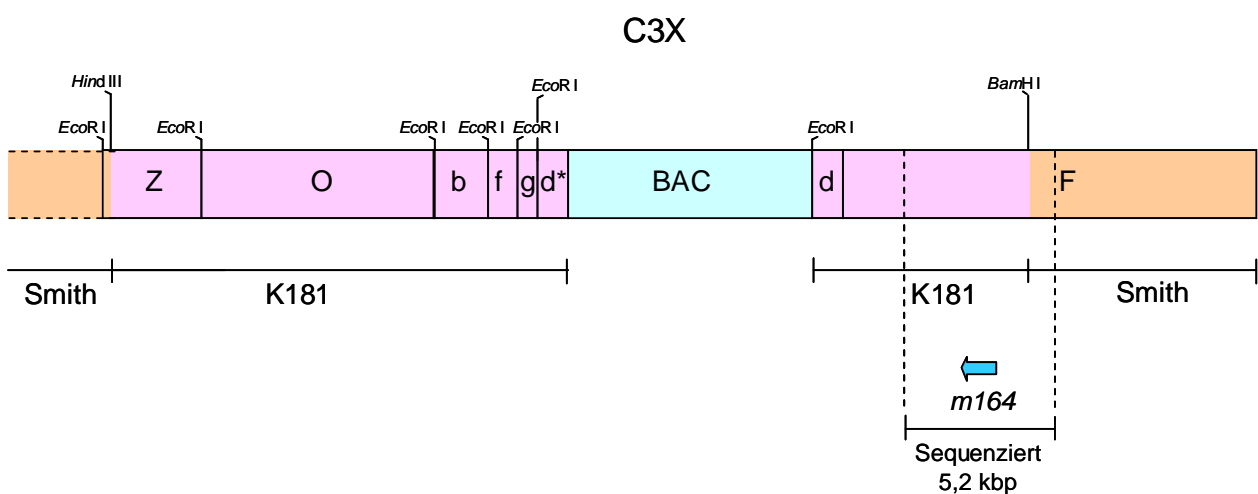


Abb. 4.2 Schematische Darstellung des Chimerismus im mCMV-BAC-WT-Plasmid (C3X). Gezeigt ist die rechte-terminale Region (*HindIII*-E-Bereich) mit den darin enthaltenen *EcoRI*-Fragmenten (Z, O, b, f, g, F). Der ORF *m164* ist mit einem blauen Pfeil dargestellt. Die mCMV-Smith Sequenz ist orange, die mCMV-K181-Sequenz ist rosa eingefärbt. Die Summe der K181-Sequenzen beträgt ~17kbp. d*, duplizierte virale Sequenz zur Entfernung der BAC-Sequenz mittels homologer Rekombination in permissiven Zellen.

Da für eine erfolgreiche homologe Rekombination mindestens 2kbp flankierende homologe Sequenzen benötigt werden, konnte eine Klonierung der homologen viralen Sequenzen nicht von dem bestehenden *Hind*III-E'-Fragment aus erfolgen, ohne noch weitere K181-Sequenzen in C3X einzubringen. Deshalb wurde zur Herstellung der m164-*Shuttle*-Plasmide eine PCR-vermittelte Subklonierung der benötigten viralen Sequenzen mit C3X-Plasmid-DNA als Matrize durchgeführt. Nach erfolgreicher homologer Rekombination konnten rekombinante mCMV-BAC-m164-Plasmide generiert werden, aus denen dann die Funktionsverlust-Mutante mCMV-m164-I265A sowie die Revertante mCMV-m164-A265I rekonstituiert werden konnte.

C3X enthält einen verkürzten ORF *m161*

Zur Herstellung der mCMV-BAC-m164-I265A- und mCMV-BAC-m164-A265I-Plasmide wurde ein 5,2kbp PCR-Amplifikat verwendet. Um unerwünschte Punktmutationen auszuschließen musste eine vollständige Sequenzierung dieses Amplifikats erfolgen. Wie bereits diskutiert, liegt der ORF *m164* innerhalb des C3X-Plasmids im Bereich der K181-Sequenzen, für die keine Sequenzinformationen existierten. Daher musste zusätzlich auch dieser Genbereich sequenziert werden und diente dann als C3X-Referenzsequenz. Ein Vergleich der beiden Sequenzierungen zeigte, dass beide Sequenzen bis auf die generierten Punktmutationen I[ATC]265A[GCC] im Codon der C-terminalen MHC-Klasse-I-Ankeraminoäure des m164-Peptids identisch sind. Somit wurden im Verlauf der PCR-vermittelten Subklonierung keine unerwünschten Mutationen erzeugt. Überraschend waren die geringen Sequenzunterschiede zwischen der C3X-Referenzsequenz und der mCMV-Sequenz nach Rawlinson et al. (1996). Das Alignment dieser beiden Sequenzen ergab lediglich zwei Abweichungen. So zeigte die Referenzsequenz C3X im ORF *m164* im Vergleich zur Rawlinson-Sequenz eine stille Mutation ohne Veränderung der entsprechenden Aminosäure. Weiterhin enthält die C3X-Referenzsequenz ein zusätzliches A im ORF *m161*. Das zusätzliche Nukleotid führt zu einer Verschiebung des offenen Leserahmens, wodurch der ORF *m161* um 39bp verkürzt wird (Sequenzvergleiche siehe Anhang 6.4).

Über die Funktion des ORFm161 Proteins ist gegenwärtig nichts bekannt. Wahrscheinlich handelt es sich um ein putatives Membran-Glykoprotein (Rawlinson et al., 1996). Eine bioinformatische *in silico* Analyse zur Bestimmung der Membrantopologie des ORFm161 Proteins, die mit zwei von einander unabhängigen Algorithmen (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form2.html> bzw. <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>) durchgeführt wurde, ergab, dass es sich um ein mögliches TypII-Membran-Glykoprotein handelt. Hingegen wurde für das verkürzte ORFm161 Protein aus C3X mit den gleichen bioinformatischen Algorithmen ein TypI-Membran-Glykoprotein vorhergesagt. Dies würde bedeuten, dass die Verkürzung des ORFs *m161*, um 39bp in C3X, zu einer Umkehrung der Membrantopologie führt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch, dass die festgestellten Unterschiede zwischen der Rawlinson Sequenz und der entsprechenden C3X-Referenzsequenz zu keinem veränderten

Phänotyp der aus dem C3X-Plasmid rekonstituierten Viren führen. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die gefundenen Mutationen bereits im ursprünglichen C3X-Plasmid enthalten sind und die daraus rekonstituierten Viren entsprechen in ihren biologischen Eigenschaften *in vivo* dem WT-mCMV (Wagner et al., 1999).

Es sei hier der Hinweis erlaubt, dass auch in der publizierten Rawlinson-Sequenz Fehler enthalten sein können, wie beispielsweise für den ORF *M45* gezeigt wurde (Brune et al., 2001).

Mutierte IE1-Proteine sind funktionell

Ziel war es, Virusmutanten zu generieren, die einen immunologischen Phänotyp zeigen, aber in ihren anderen biologischen Eigenschaften möglichst wenig verändert sind. Aus diesem Grund wurde nicht das gesamte immunogene Protein deletiert, sondern wurden Punktmutationen gesetzt, die gezielt die Präsentation eines antigenen Peptids verhindern. Wie bereits erwähnt, ist die für das IE1-Peptid durchgeführte Mutation L176A formal der konservativste Austausch, was jedoch einen Funktionsverlust des IE1-Proteins nicht ausschließt. Das IE1-Protein ist zwar nicht essentiell für Replikation in Zellkultur, ist aber wesentlich für eine effiziente *in vivo*-Replikation in ruhenden Zellen und somit für die *in vivo*-Virulenz (Ghazal et al., 2005). Dies beruht sehr wahrscheinlich auf der Fähigkeit des IE1-Proteins, zelluläre Gene des Nukleotidmetabolismus, wie z. B. das Thymidylat Synthase (TS)- Gen (Gribaudo et al., 2000) und das Ribonukleotid-Reduktase (RNR)-Gen (Lembo et al., 2000) zu transaktivieren. Die in dieser Arbeit durchgeführten Dual-Luciferase-Reporter- (DLR)-Assays zur Überprüfung der Funktionalität der mutierten IE1-Proteine als Transaktivatoren ergaben keinen negativen Einfluss der Mutationen IE1-L176-A und IE1-A176F auf die Transaktivator-Funktion des IE1-Proteins für die Expression von TS oder RNR. Überraschend war jedoch die Beobachtung, dass das IE1-Protein mit der Mutation IE1-A176L* im DLR-Assay funktionell inaktiv war, obwohl die Aminosäure-Sequenz dieses Proteins der des WT-IE1-Proteins entsprechen sollte. Tatsächlich zeigte ein Sequenzvergleich (Daten nicht gezeigt) zwischen den drei mutierten Genregionen von IE1-L176A, IE1-A176F, IE1-A176L* und der WT-IE1-Sequenz *upstream* der DNA-Sequenz des mutierten IE1-Peptids IE1-A176L* bei Nukleotidposition 181.054 (Sequenzangabe nach Rawlinson et al., 1996) eine nicht intendierte Punktmutation TAT→TGT. Diese unbeabsichtigte Mutation führt gleichzeitig zu einer Veränderung der entsprechenden Aminosäure Y165C im resultierenden IE1-A176L*-Protein und könnte somit für den Verlust der Transaktivator-Funktion verantwortlich sein. Die mit Hilfe des Programms *NetPhos* 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>; Referenz: Blom et al., 1999) durchgeführte bioinformatische Analyse zur Wahrscheinlichkeit einer Tyrosinphosphorylierungs-Site am Y165 des IE1-Proteins ergab einen *score* von 0,047. Für eine potentielle Tyrosinphosphorylierungs-Site müsste der *score* jedoch mindestens $\geq 0,5$ sein. Trotz dieser bioinformatischen Vorhersage, die für Y165 keine Tyrosinphosphorylierungs-Site beinhaltet, könnte diese dennoch phosphoryliert werden und somit auch zu einer Aktivierung der Transaktivator-Funktion des IE1-Proteins

beitragen. Der Verlust der transaktivierenden Eigenschaften des IE1-Proteins könnte jedoch auch durch eine Konformationsänderung erklärt werden, da über die freie SH-Gruppe am entstandenen C165 neue Disulfid-Bindungen geknüpft werden können. Dennoch kann z. Z. nicht beantwortet werden, welcher Effekt genau für die Aufhebung der Transaktivator-Funktion verantwortlich ist. Dass diese Mutation prinzipiell für den Verlust der Transaktivator-Funktion verantwortlich ist, kann durch aktuelle Ergebnisse der Arbeitsgruppe belegt werden. In einer auf dem Plasmid-*Backbone* des defekten IE1-A176L*-Proteins basierenden „*Rescue*-Mutante“ C165Y ist die Transaktivator-Funktion des „IE1-*Rescue*-Proteins“ wieder hergestellt. Die „*Rescue*-Mutante“ wurde durch Deletion eines 1,8kbp großen Bereichs; der die unbeabsichtigte Mutation trägt; und anschließender Re-Insertion der entsprechenden DNA-Sequenz des WT-IE1-Proteins hergestellt. Eine Degradation der mutierten RNA im Zytoplasma bzw. im Nukleoplasma, z. B. durch den Exosomen-Komplex (La Cava et al., 2005, zur Übersicht siehe Raijmakers et al., 2004) oder nicht-translatierbare sekundär/tertiär Strukturen dieser RNA als Folge der Mutation, können allerdings ausgeschlossen werden, da das IE1-A176L*-Protein immunhistochemisch sowohl in Zellkultur als auch *in vivo* nachweisbar ist.

***In vitro* und *in vivo*-Replikation der mCMV-IE1-Mutanten**

Durch Ermittlung der Genom-zu-PFU-Verhältnisse der Rekombinanten mCMV-IE1-L176A, mCMV-IE1-A176L und mCMV-IE1-A176F im Vergleich zu mCMV-BAC-WT bzw. WT-mCMV (Smith) konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Viren dieselbe Anzahl viraler Genome benötigen, um die Bildung eines infektiösen, Plaque-bildenden Ereignisses (PFU) zu gewährleisten. Damit konnte gleichzeitig ein bereits von unserer Arbeitsgruppe veröffentlichtes Genom-zu-PFU Verhältnis von ~500:1 bestätigt werden (Kurz et al., 1997; Grzimek et al., 2001). Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Genom-zu-PFU-Verhältnisse liegen allerdings nicht exakt bei 500:1 sondern zeigen einen Schwankungsbereich von 300:1 bis 800:1. Die Bestimmung der Genom-zu-PFU-Verhältnisse ist in dieser Arbeit erstmals mit einer äußerst sensitiven und spezifischen qPCR erfolgt. Von daher ist es umso beeindruckender, dass das von Kurz et al. und Grzimek et al. bestimmte Genom-zu-PFU-Verhältnis in seiner Größenordnung bestätigt werden konnte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten weiter zeigen, dass alle generierten mCMV-IE1-Mutanten sowie Revertanten ohne signifikante Beeinflussung *in vitro* in permissiven Fibroblasten und *in vivo* in murinen Hepatozyten replizieren. Zudem konnte dieser Befund auch für die Milz und den Virus-Applikationsort Pfote in immunsupprimierten Tieren bestätigt werden. Die Zerstörung der Antigenität des IE1-Proteins durch Punktmutation der C-terminalen MHC-Klasse-I-Ankeraminosäure L176A des IE1-Peptids in der Mutante mCMV-IE1-L176A führte wie erwartet, nicht zu einer attenuierten produktiven mCMV-Infektion. Dieser Befund sollte durch weitere

Experimente, die zusätzlich Informationen zur *in vivo*-Infektiosität der untersuchten viralen Partikel liefern, beispielsweise durch Bestimmung von Virustitern aus unterschiedlichen Organen, gestützt werden. Außerdem sollte eine Bestimmung der latenten DNA-Load in verschiedenen Organen nach experimenteller KMT und Infektion mit den verschiedenen IE1-Rekombinanten im Vergleich zu WT-mCMV durchgeführt werden, denn ein potentieller Replikations-Defekt der IE1-Rekombinanten könnte auch die finale Load latenter virale Genome in CMV-Zielorganen beeinflussen (Reddehase et al., 1994).

Interessanterweise wurde für die Rekombinante mCMV-IE1-A176L* ein Genom-zu-PFU-Verhältnis von 1200:1 ermittelt; damit ist die Zahl der mCMV-IE1-A176L*-Genome, die zur Ausbildung eines Plaques benötigt werden, mehr als doppelt so groß wie die Zahl der mCMV-Genome zur Ausbildung eines WT-mCMV-Plaques. Im Vergleich zu den anderen Mutanten ist das Genom-zu-PFU-Verhältnis etwa doppelt so groß. Das erhöhte Genom-zu-PFU-Verhältnis von mCMV-IE1-A176L* könnte in einem kausalen Zusammenhang zur fehlenden Transaktivator-Funktion des IE1-A176L*-Proteins stehen. Die Punktmutation bei Nukleotidposition 181.054 TAT→TGT, die zur Zerstörung der Transaktivator-Funktion des IE1-A176L*-Proteins in diesem Transfektions-System geführt hat, ist auch im rekombinanten Virus mCMV-IE1-A176L* vorhanden. Das erhöhte Genom-zu-PFU-Verhältnis dieser Rekombinante, in Kombination mit der fehlenden Transaktivator-Funktion des IE1-A176L*-Proteins auf zelluläre Gene des Nukleotidmetabolismus, legte die Vermutung nahe, dass mCMV-IE1-A176L* im Vergleich zu mCMV-BAC-WT und WT-mCMV bzw. zu den übrigen Rekombinanten eine veränderte *in vivo*-Replikation aufweist. Für die Rekombinante mCMV-IE1-A176L* konnte jedoch keine attenuierte *in vivo*-Replikation festgestellt werden. Dies könnte bedeuten, dass die zuvor diskutierte Transaktivator-Funktion des IE1-Proteins für eine effiziente *in vivo*-Replikation unter den gewählten Versuchsbedingungen tatsächlich entbehrlich ist.

In vivo Untersuchungen, die mit einer IE1-Exon-4-Deletionsmutante durchgeführt wurden, zeigten im Vergleich zu WT-mCMV deutlich niedrigere Virustiter in Leber, Niere, Milz und Speicheldrüse (Ghazal et al., 2005). Unter der Annahme, dass das IE1-A176L*-Protein auch *in vivo* nicht funktionell ist, sollten die Organtiter von mit mCMV-IE1-A176L* infizierten Tieren im Vergleich zur WT-mCMV-Infektion deutlich erniedrigt sein. Dies setzt natürlich voraus, dass die Transaktivator-Funktion des IE1-Proteins auf zelluläre Gene des Nukleotidmetabolismus auch *in vivo* relevant ist. Ob dies so ist, muss durch weitere Versuche geklärt werden.

Im Unterschied zur IE1-Exon-4-Deletionsmutante, in welcher kein IE1-Protein gebildet wird (Ghazal et al., 2005), ist das IE1-A176L*-Protein nach Infektion mit der Revertante mCMV-IE1-A176L* vorhanden und kann immunhistologisch nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wäre es denkbar, dass andere wichtige Funktionen des IE1-A176L*-Proteins noch existent sind, wie beispielsweise die Repression der Histon-Deacetylase-2 (HDAC-2), die indirekt zur Öffnung von Chromatinstrukturen und damit zu einer Erhöhung der transkriptionellen Aktivität führen kann

(mCMV: Tang & Maul, 2004; hCMV: HDAC-3, Nevels et al., 2004). Auch eine funktionelle Inaktivierung zellulärer Repressor-Moleküle, wie des promyelotischen Leukämie Proteins (PLP) und/oder von Daxx durch Bindung an das IE1-Protein soll zu einer Beschleunigung der produktiven Infektion führen (Tang & Maul, 2004, zur Übersicht siehe Tang & Maul, 2005). Dies konnte ebenfalls für das IE1-Protein von hCMV gezeigt werden (Ahn et al., 1998; Koriath et al. 1996; Wilkinson et al., 1998).

Wie wir mittlerweile wissen, zeigen aktuelle longitudinale Analysen der Viruslast im Blut bislang keine signifikanten Unterschiede nach Infektion mit den verschiedenen IE1-Rekombinanten im Vergleich zu mCMV-BAC-WT. Etwa zwei Monate nach Infektion sind die Viren im Blut immunkompetenter Tiere eliminiert, wohingegen in Tieren nach KMT erst nach 4 Monaten die Clearance erfolgt ist. Von besonderem Interesse ist es, ob dieses Ergebnis auch für eine longitudinale Analyse der Organtiter aus Leber, Lunge und Milz zutrifft.

Bestätigung des Antigenitätsverlustes der beiden immundominanten Epitope auf Ebene des CD8 T-Zell-Primings

Die immunologische Charakterisierung der mCMV-Mutanten und -Revertanten erfolgte im IFN- γ ELISpot Assay. Dabei sollte primär *in vivo* die Frage beantwortet werden, ob die immundominanten Epitope von mCMV, also das IE1-Peptid (Reddehase & Koszinowski, 1984; Reddehase et al., 1989) sowie das m164-Peptid (Holtappels et al., 2002a), einzeln oder in Kombination durch Austausch der jeweiligen C-terminalen MHC-Ankeraminosäure (X \rightarrow A) zerstört wurden. Gleichzeitig sollte die Fähigkeit der Mutanten und Revertanten, CD8 T-Zellen *in vivo* zu aktivieren, anhand der Frequenz mCMV-Peptid-spezifischer CD8 T-Zellen in der akuten sowie in der Memory Phase der Immunantwort beurteilt werden.

Nach Infektion immunkompetenter BALB/c Mäuse mit den Funktionsverlust-Mutanten mCMV-IE1-L176A respektive mCMV-m164-I265A waren die korrespondierenden CD8 T-Zellantworten tatsächlich völlig ausgelöscht. Zudem führt eine Infektion immunkompetenter BALB/c Mäuse mit mCMV-IE1-L176A-m164-I265A (Doppelmutante) zur Auslöschung beider CD8 T-Zellspezifitäten. Damit ist indirekt bewiesen, dass weder das mutierte IE1-Peptid noch das mutierte m164-Peptid auf infizierten Zellen *in vivo* präsentiert wird. In den entsprechenden Revertanten hingegen sind diese CD8 T-Zellspezifitäten wieder vorhanden. Für andere Virusinfektionen gibt es Hinweise darauf, dass sich die Spezifitätenverteilung während der Konstitution der primären Immunantwort von der entsprechenden Spezifitätenverteilung der Memory T-Zellantwort unterscheidet (Van der Most et al., 1996; Bergmann et al., 1999). Zwischen akuter und Memory Immunantwort gegen mCMV waren jedoch keine signifikanten Unterschiede zu beobachten.

Außerdem konnte mit den Mutanten nachgewiesen werden, dass die Frequenz der beiden dominanten T-Zellspezifitäten bei Immunantworten nach WT-mCMV-Infektion nicht durch

kreuzreaktive CD8 T-Zellen anderer Spezifität beeinflusst wird (Zur Beeinflussung des CD8 T-Zell Repertoires durch Kreuzreaktivität siehe Selin et al., 2004 und Brehm et al., 2002.).

Das Konzept der Immundomination besagt, dass die Stellung eines Epitops in der Epitop-Hierarchie von anderen Epitopen abhängig ist (Yewdell & Bennink, 1999). Es ist bekannt, dass Epitop-Hierarchien eine Änderung erfahren können, wenn T-Zellepitope beispielsweise durch *escape* Mutationen verloren gehen (Nowak et al., 1995; Goulder et al., 1997; Mothe et al., 2002). Unter bestimmten Bedingungen können sogar extrem schwache Epitope dominant werden (van der Most et al., 2002). Aus diesem Grund wurde geprüft, ob nach Auslöschung beider dominanter Epitope von mCMV - einzeln oder in Kombination - andere der z. Z. bekannten CD8 T-Zellspezifitäten im Haplotyp *H-2^d* (zur Übersicht siehe Reddehase, 2002 und Holtapples et al., 2005) immundominant werden. Dabei zeigte sich, dass nur die Frequenz subdominanter m18-Peptid-spezifischer CD8 T-Zellen - besonders nach Auslöschung beider immundominanter Epitope - leicht aber signifikant und reproduzierbar erhöht ist. Eine grundlegende Änderung in der Hierarchie derzeit bekannter mCMV-Peptid-spezifischer CD8 T-Zellen konnte jedoch nicht beobachtet werden.

Interessant ist die Tatsache, dass der Verlust der beiden dominanten CD8 T-Zellspezifitäten im immunkompetenten Tier vollständig kompensiert werden konnte. Ob eine neue, bislang unbekannte Spezifität für diesen Schutz verantwortlich ist oder ob die Gesamtheit der subdominanten Spezifitäten dafür verantwortlich ist, bleibt offen. Die Frage, ob subdominante Spezifitäten den Verlust von dominanten Spezifitäten kompensieren, ist auch Gegenstand aktueller Arbeiten anderer Arbeitsgruppen (Andreansky et al., 2005; Webby et al., 2003).

In immunkompetenten Tieren kann die Immunkontrolle prinzipiell auch über andere Effektorzell- Populationen, wie z.B. NK-Zellen, erfolgen (zur Übersicht siehe Webb et al., 2002), die das Fehlen von protektiven T-Zellspezifitäten kompensieren. Nach experimenteller KMT und konkurrierender mCMV-Infektion wird das Überleben der Tiere jedoch allein durch die Rekonstitution antiviraler CD8 T-Zellen gewährleistet (Reddehase et al., 1985; Podlech et al., 1989, 2000; zur Übersicht siehe Holtappels et al., 2005). Daher stellt sich nun die interessante Frage, ob nach KMT und Infektion mit der IE1- bzw. m164-Mutante sowie insbesondere mit der Doppelmutante die Virusinfektion nach wie vor kontrolliert werden kann und ob nach KMT eventuell eine neue CD8 T-Zellspezifität sichtbar wird, die in immunkompetenten Tieren bislang nicht beobachtet werden konnte. Ferner ist zu prüfen, ob sich die Epitop-Hierarchie unter diesen Bedingungen verändert.

Kontrolle der Latenz-assoziierten IE1-Genexpression durch IE1-Epitop-spezifische CD8 T-Zellen

Wie aktuelle Daten zeigen, konnte die eingangs aufgestellte Hypothese eines Einflusses IE1-Epitop-spezifischer CD8 T-Zellen auf die virale Genexpression in der Latenz durch die Mutante mCMV-IE1-L176A (Daten nicht gezeigt, Manuskript in Vorbereitung) bestätigt werden. Dazu wurden zwei KMTs durchgeführt, wobei jeweils die Mutante mCMV-IE1-L176A mit einer Revertante verglichen wurde, mit mCMV-IE1-A176L (12 Monate nach KMT) und mit mCMV-IE1-A176L* (8 Monate nach KMT). In beiden Experimenten war hinsichtlich der Menge an latenter viraler DNA in der Lunge kein Unterschied zwischen Mutante und Revertante festzustellen. Dagegen führt die Auslöschung des IE1-Peptids in der Mutante in beiden Experimenten tatsächlich zu einer signifikanten Erhöhung der Frequenz Latenz-assoziiertes IE1-Transkriptionsereignisse, nämlich um ~ Faktor 5. Wir fanden in einigen Lungenstücken auch IE3-Transkripte und in einem Lungenstück konnte sogar die Transaktivierung nachgeschalteter E-Gene, wie des als Markergen gewählten essentiellen Gens *M55/gB* nachgewiesen werden. Damit konnte die aufgestellte Hypothese bestätigt werden!

Dies ist der erste Beleg für eine Kontrolle der Latenz-assoziierten IE1-Genexpression durch IE1-Epitop-spezifische CD8 T-Zellen und damit für eine Präsentation des IE1-Peptids während der Latenz.

Wir gehen davon aus, dass in Gegenwart IE1-Epitop-spezifischer CD8 T-Zellen IE1-Reaktivierungsereignisse wahrgenommen und die exprimierenden Zellen ausgelöscht werden. Die dennoch messbare, wenn auch niedrige Frequenz an IE1-Transkriptionsereignissen zeigt die Expression in Zellen, die zum Zeitpunkt einer Momentaufnahme (Schockgefrieren der Lunge) gerade noch nicht ausgelöscht waren. Die Versuche zeigen aber auch, dass neben einer Immunkontrolle der Latenz noch molekulare Kontrollmechanismen wirksam sein müssen.

***Silencing/Desilencing* und *Immune Sensing* Hypothese**

Diese aktuellen Daten in Kombination mit den bisherigen Daten der Arbeitsgruppe führen uns zu einer Hypothese zur Klärung von CMV-Latenz und Reaktivierung:

Kernpunkt der Hypothese ist die duale Steuerung von Viruslatenz und Reaktivierung durch Genregulatorische Mechanismen von *Gene Silencing* (Latenz) und *Gene Desilencing* (Reaktivierung) durch Bildung geschlossener und offener Chromatinstruktur am viralen Genom (*Chromatin Remodeling*; zur Übersicht siehe Ehrenhofer-Murray, 2004; Vermaak et al., 2003), sowie durch Erkennung und Termination von Reaktivierungsereignissen durch CD8 T-Zellen nach Präsentation antigener Peptide (zum besseren Verständnis der Hypothese ist diese in Abb. 4.3 grafisch veranschaulicht).

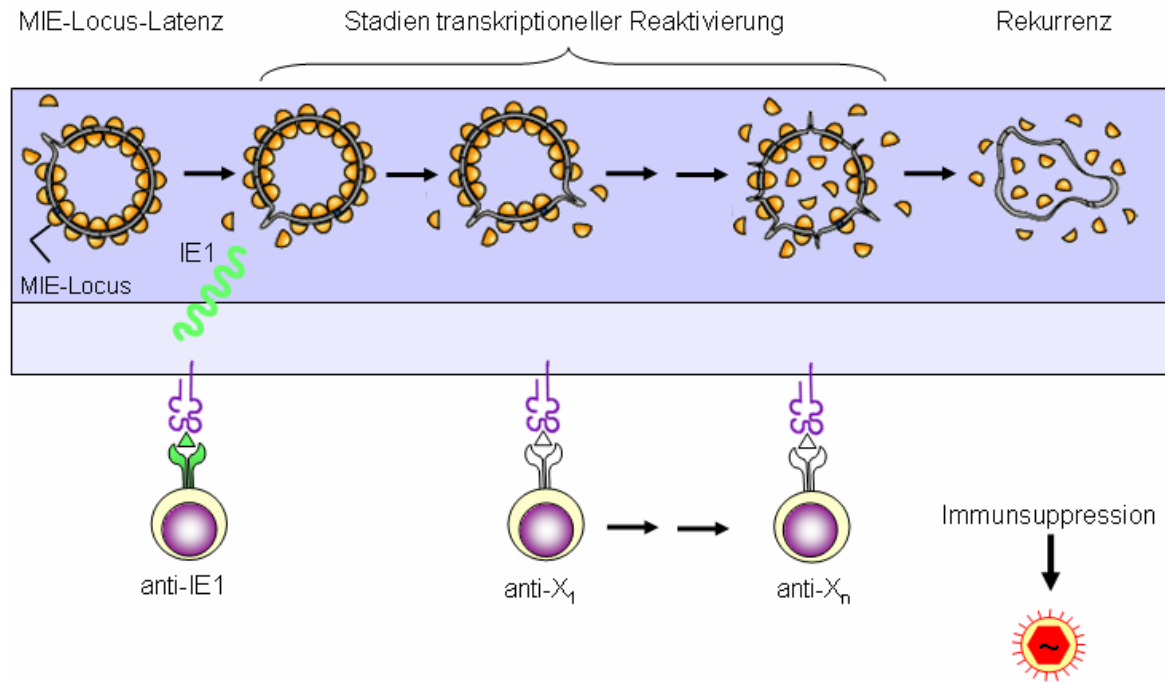


Abb. 4.3 Modell: *Silencing/Desilencing* und *Immune Sensing* Hypothese (aus Simon et al., 2005b)

Rekurrenz von infektiösem Virus hat demnach zwei Voraussetzungen:

Voraussetzung 1: Eine offene Chromatinstruktur an allen für Replikation und Morphogenese essentiellen Loci des viralen Genoms.

Voraussetzung 2: Ausschaltung der Immunkontrolle durch Immunsuppression.

Voraussetzung 1 muss nicht zwingend bedeuten, dass alle essentiellen Loci gleichzeitig geöffnet sind. Entscheidend ist, dass das jeweilige Protein dann verfügbar ist, wenn es für den Fortgang des Replikationszyklus benötigt wird. Es ist also auch ein dynamisches Modell des Öffnens und Schließens denkbar, in dem ein essentielles Gen exprimiert wird und das entsprechende Protein zur Verfügung steht, während das Gen selbst bereits wieder abgeschaltet wurde. Offensichtlich ist aber, dass kein Virus entstehen kann, wenn auch nur ein einziges essentielles Gen dauerhaft in einer geschlossenen Chromatinstruktur verbleibt. Dieser Teil der Hypothese wird durch Arbeiten zur hCMV-Latenz gestützt (Reeves et al., 2005; Murphy et al., 2002). Es gibt inzwischen gute Hinweise darauf, dass die latente virale DNA als zirkuläres Plasmid vorliegt und in Chromatin-ähnlicher, wenngleich von Nukleosomen unterschiedener, Struktur höherer Ordnung mit Histonen assoziiert ist, und dass transkriptionelle Aktivität am MIE-Locus mit offener Chromatinstruktur einhergeht (zur Übersicht siehe Bain et al., 2005). Bislang war man in der Literatur fälschlicherweise davon ausgegangen, dass MIE-Genexpression mit Virusreaktivierung gleichzusetzen sei (Yuhasz et al., 1994). Wie im Modell dargestellt, ist Aktivität am MIE-Locus zwar als „Initialzündung“ des replikativen Zyklus Voraussetzung für die Expression

nachgeschalteter E-Phase-Gene, allerdings erfordert eine vollständige Reaktivierung auch eine offene Chromatinstruktur an nachgeschalteten Genen. Wir konnten zeigen, dass nur ein geringer Anteil latenter Genome am MIE-Locus aktiv ist (Simon et al., 2005b). Dies bedeutet nicht, dass die Mehrheit der viralen Genome transkriptionell inaktiv ist. Vielmehr konnten nicht getestete andere virale Gene aktiv sein, weshalb wir den Begriff „MIE-Locus-Latenz“ vorgeschlagen haben (Simon et al., 2005b). Diese putativen Expressionen außerhalb des MIE-Locus werden allerdings nicht produktiv sein, da das MIE-Genprodukt IE3 als Transaktivator essentiell ist (Angulo et al. 2000).

An welchen Stellen der reaktivierten viralen Genexpression das *Immune Sensing* durch CD8 T-Zellen wirksam werden kann, hängt, so die Hypothese, vom Repertoire antigener Peptide ab und wird somit von der MHC-Immungenetik bestimmt. In BALB/c ist ein IE1-Peptid immundominant, sodass eine Kontrolle bereits auf Stufe der reaktivierten IE1-Genexpression erfolgen kann. In C57BL/6, wo noch kein IE1-Epitop nachgewiesen werden konnte (M. Munks, in Holtappels et al., 2005), erfolgt die Immunkontrolle entsprechend später, sobald Gene exprimiert werden, die für *H-2^b*-restringierte Epitope kodieren.

4.2 Fazit und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte die Technik der BAC-Mutagenese (in Anlehnung an die Arbeiten von Messerle et al., 1997; Borst et al., 1999, 2004; Wagner et al., 1999) herpesviraler Genome erfolgreich in der Arbeitsgruppe etabliert werden. Mittels BAC-Technologie wurden in dieser Arbeit erstmals Punktmutationen in das mCMV-BAC-Genom inseriert. Diese neue Technologie ermöglicht der Arbeitsgruppe eine wesentlich einfachere und vor allem auch deutlich schnellere Herstellung rekombinanter mCMV. Die im Verlauf dieser Arbeit generierten und charakterisierten rekombinanten mCMV dienten nicht nur zur Etablierung der Methode, sondern stellen essentielle Voraussetzungen für zukünftige Projekte dar. Von besonderer Wichtigkeit war die Herstellung der Mutante mCMV-IE1-L176A, die zur Auslöschung IE1-Epitop-spezifischer CD8 T-Zellen führt. Mit dieser Mutante war es möglich, die eingangs formulierte Hypothese „IE1-Peptid-spezifische CD8 T-Zellen erkennen latent infizierte Zellen in der ersten Stufe transkriptioneller Reaktivierung“ zu evaluieren. Wie aktuelle Daten zeigen, führt die Auslöschung des IE1-Peptids in der Mutante tatsächlich zu einer signifikanten Erhöhung der Frequenz Latenz-assoziiierter IE1-Transkriptionseignisse. Damit konnte erstmals der Beweis für eine Kontrolle der Latenz-assoziierten IE1-Genexpression durch IE1-Epitop-spezifische CD8 T-Zellen und damit für eine Präsentation des IE1-Peptids während der Latenz erbracht werden.

Die bisherigen Erkenntnisse führen uns zur „**Silencing/Desilencing und Immune Sensing Hypothese**“ zur Erklärung von CMV-Latenz und Reaktivierung. Kernpunkt der Hypothese ist eine doppelte Absicherung der Latenz durch *Gene Silencing* und durch immunologische Auslöschung von Zellen, in denen durch *Desilencing* Gene aktiviert werden, die für antigene Peptide in

verschiedenen Stadien der reaktivierten viralen Genexpression kodieren. Reaktivierung des vollständigen produktiven Zyklus erfordert demnach *Desilencing* aller essentiellen viralen Gene durch Erzeugen offener Chromatinstrukturen am zuvor latenten viralen Genom, sowie eine gleichzeitige Ausschaltung der Immunkontrolle. Die neue Arbeitshypothese soll durch weitere Daten entweder gestützt gegebenenfalls korrigiert oder sogar widerlegt werden. Folgende weiterführende Experimente sind geplant:

- Zur Überprüfung der Hypothese der lokal geschlossenen und offenen Chromatinstrukturen (*Silencing/Desilencing*) soll eine Multiplex-RT-PCR etabliert werden, um somit die Expression ausgewählter viraler Markergene, wie beispielsweise für die Replikation und Morphogenese essentieller Gene oder Antigen-kodierender Gene, zu erfassen. Um alle ORFs global zu erfassen, könnte auch an den Einsatz eines mCMV-ORF *low density* Arrays gedacht werden. Allerdings ist es fraglich, ob die Sensitivität der Array-Analyse ausreichen wird, um die zu erwartenden geringen RNA-Mengen nachzuweisen.
- Nach unserer Arbeitshypothese ist eine offene Chromatinstruktur an den essentiellen Genloci des viralen Episoms eine primäre Voraussetzung für Virus-Rekurrenz. Darum wäre es interessant, den Einfluss von *in vivo* Chromatin-Remodelling durch experimentelles Öffnen des Chromatins mittels Inhibitoren der DNA-Deacetylierung (Trichostatin A (TSA) und/oder Valproinsäure (VPA)) zu untersuchen. Zudem gilt es zu prüfen, ob eine Kombination von Bestrahlung und TSA/VPA zu einer erhöhten Virus-Rekurrenz führt.

Wir erwarten nach dem Öffnen der Chromatinstruktur eine breite transkriptionelle Aktivität, die natürlich auch zu einer entsprechenden Präsentation antigener Peptide führt. Es ist also möglich oder sogar wahrscheinlich, dass selbst unter diesen experimentellen Bedingungen die Genexpression des latenten WT-mCMV die E-Phase nicht erreicht. Deshalb können auch hier die in dieser Arbeit generierten Epitop-Mutanten zum Einsatz gebracht werden.

5 Literaturverzeichnis

- Abbate, J., J. C. Lacayo, M. Prichard, G. Pari, and M. A. McVoy.** 2001. Bifunctional protein conferring enhanced green fluorescence and puromycin resistance. *Biotechniques* **31**: 336-340.
- Adler, H., M. Messerle, and U. H. Koszinowski.** 2001. Virus reconstituted from infectious Bacterial Artificial Chromosome (BAC)-cloned murine gammaherpesvirus 68 acquires wild-type properties *in vivo* only after excision of BAC vector sequences. *J. Virol.* **75**: 5692-5696.
- Ahn, J. H., E. J. Brignole 3rd, and G. S. Hayward.** 1998. Disruption of PML subnuclear domains by the acidic IE1-Protein of human cytomegalovirus is mediated through interaction with PML and may modulate a RING finger-dependent cryptic transactivator function of PML. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 4899-4913.
- Andreansky, S. S., J. Stambas, P. G. Thomas, W. Xie, R. J. Webby, and P. C. Doherty.** 2005. Consequences of immunodominant epitope deletion for minor influenza virus-specific CD8⁺-T-cell responses. *J. Virol.* **79**: 4329-4339.
- 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.
- 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.
- Azuma, M., M. Cayabayb, D. Buck, J. H. Phillips, and L. L. Lanier.** 1992. CD28 interaction with B7 costimulates primary allogeneic proliferative responses and cytotoxicity mediated by small, resting T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **175**: 353-360.
- Bain, M., M. Reeves, and J. H. Sinclair.** 2005. Regulation of HCMV Gene Expression by Chromatin Remodelling Chapter 9 *In Cytomegaloviruses: Molecular Biology and Immunology* (M. J. Reddehase, ed.). Caister AcademicPress, Hethersett, Norwich, U. K.; im Druck.
- 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.
- Bergmann, C. C., J. D. Altman, D. Hinton, and S. A. Stohlman.** 1999. Inverted immunodominance and impaired cytolytic function of CD8⁺ T cells during viral persistence in the central nervous system. *J. Immunol.* **163**: 3379-3387.
- Bichko, V. V., T. M. Kozlovskaya, A. Dishler, P. Pumpen, A. Janulaitis, and E. J. Gren.** 1982. Restriction map of the hepatitis B virus DNA cloned in *Escherichia coli*. *Gene* **20**:481-484.
- Blom, N., S. Gammeltoft, and S. Brunak.** 1999. Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J. Mol. Biol.* **294**: 1351-1362.
- 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.
- Boehme, K. W., and T. Compton.** 2005. Virus Entry and Activation of Innate Immunity. Chapter 6 *In Cytomegaloviruses: Molecular Biology and Immunology* (M. J. Reddehase, ed.). Caister AcademicPress, Hethersett, Norwich, U. K., im Druck.
- Boppana, S.B., R. F. Pass, W. J. Britt, S. Stagno, and C. A. Alford.** 1992. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal morbidity and mortality. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **11**: 93-99.
- Boppana, S.B., K.B. Fowler, Y. Vaid, G. Hedlund, S. Stagno, W. J. Britt, and R. F. Pass.** 1997. Neuroradiographic findings in the newborn period and long-term outcome in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Pediatrics* **99**: 409-414.

- 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.
- Borst, E.-M., G. Pósfai, F. Pogoda, and M. Messerle.** 2004. Mutagenesis of herpesvirus BACs by allele replacement. In *Bacterial Artificial Chromosomes Volume 2: Functional Studies*, S. Zhao and M. Stodolsky, eds. (Totowa, NJ: Humana Press Inc.), pp. 269-280.
- Boyle, K. A., and T. Compton.** 1998. Receptor-binding properties of a soluble form of human cytomegalovirus glycoprotein B. *J. Virol.* **72**: 1826-1833.
- Brehm, M. A., A. K. Pinto, K. A. Daniels, J. P. Schneck, R. M. Welsh, and L. K. Selin.** 2002. T cell immunodominance and maintenance of memory regulated by unexpectedly cross-reactive pathogens. *Nat. Immunol.* **3**: 627-634.
- Britt W. J., and C. A. Alford.** 1996. Cytomegalovirus. In *Fields Virology 3rd Edition*. Vol 2: 2493-2523.
- Brune, W., C. Menard, J. Heesemann, and U. H. Koszinowski.** 2001. A ribonucleotide reductase homolog of cytomegalovirus and endothelial cell tropism. *Science* **291**: 303-305.
- Brune, W., M. Wagner; and M. Messerle.** 2005. Manipulating Cytomegalovirus Genomes by BAC Mutagenesis: Strategies and Applications. Chapter 4 *In Cytomegaloviruses: Molecular Biology and Immunology* (M. J. Reddehase, ed.). Caister Academic Press, Hethersett, Norwich, U. K., im Druck.
- 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.
- Busch, D. H., K. Kerksiek, and E. G. Pamer.** 1999. Processing of *Listeria monocytogenes* antigens and the *in vivo* T-cell response to bacterial infection *Immunol. Rev.* **172**: 163-169.
- 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, T. A., E. Tom, G. W. Kemble, G. M. Duke, E. S. Mocarski, R. R. Spaete.** 1996. Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *J. Virol.* **70**: 78-83.
- 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.
- Chang, W. L., and P. A. Barry.** 2003. Cloning of the full-length rhesus cytomegalovirus genome as an infectious and self-excisable bacterial artificial chromosome for analysis of viral pathogenesis. *J. Virol.* **77**: 5073-5083.
- Chang, S. C., F. Momburg, N. Bhutani, and A. L. Goldberg.** 2005. The ER aminopeptidase, ERAP1, trims precursors to lengths of MHC class I peptides by a "molecular ruler" mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**: 17107-17112.
- Chartier, C., E. Degryse, M. Gantzer, A. Dieterle, A. Pavirani, and M. Mehtali.** 1996. Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in *Escherichia coli*. *J. Virol.* **70**: 4805-4810.
- Cherepanov, P. P., and W. Wackernagel.** 1995. Gene disruption in *Escherichia coli*: Tc^R and Km^R cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* **158**: 9-14.
- Chee, M. S., A. T Bankier, S. Beck, R. Bohni, C. M. Brown, R. Cerny, T. Horsnell, C. A. 3rd Hutchison, 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**: 125-69.
- 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.

- 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.
- Cranmer, L. D., C. L. Clark, C. S. Morello, H. E. Farrell, W. D. Rawlinson, and D. H. Spector.** 1996. Identification, analysis, and evolutionary relationships of the putative murine cytomegalovirus homologs of the human cytomegalovirus UL82 (pp71) and UL83 (pp65) matrix phosphoproteins. *J. Virol.* **70**:7929-7939.
- Dahle, A. F., K. B. Fowler, J. D. Wright, S. B. Boppana, W. J. Britt, and R. F. Pass.** 2000. Longitudinal Investigation of Hearing Disorders in Children with Congenital Cytomegalovirus. *J. Am. Acad. Audiol.* **11**: 283-290.
- Daniels, K. A., G. Devora, W. C. Lai, C. L. O'Donnel, M. Bennet, and R. M. Welsh.** 2001. Murine cytomegalovirus is regulated by a discrete subset of natural killer cells reactive with monoclonal antibody to Ly49H. *J. Exp. Med.* **194**: 29-44.
- Datsenko K., A., and B. L. Wanner.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 6640-6645.
- Davison, A. J., A. Dolan, P. Akter, D. J. Dargan, D. J. Alcendor, D. J. McGeoch, and G. S. Hayward.** 2003. The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *J. Gen. Virol.* **84**: 17-28.
- Delecluse, H. J., T. Hilsendegen, D. Pich, R. Zeidler, and W. Hammerschmidt.** 1998. Propagation and recovery of intact, infectious Epstein-Barr virus from prokaryotic to human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 8245-8250.
- Del Val, M., K. Münch, M. J. Reddehase, and U. H. Koszinowski.** 1989. Presentation of CMV immediate-early antigen to cytolytic T lymphocytes is selectively prevented by viral genes expressed in the early phase. *Cell.* **58**: 305-315.
- Dolan, A., C. Cunningham, R. D. Hector, A. F. Hassan-Walker, L. Lee, C. Addison, D. J. Dargan, D. J. McGeoch, D. Gatherer, V. C. Emery, P. D. Griffiths, C. Sinzger, B. P. McSharry, G. W. Wilkinson, and A. J. Davison.** 2004. Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* **85**: 1301-1312.
- Donahue Jr., A., and F. R. Bloom.** 1998. Transformation efficiency of *E. coli* electroporated with large plasmid DNA. *FOCUS®*. **20**: 77-78.
- Dorsch-Häsler, K., G. M. Keil, F. Weber, M. Jasin, W. Schaffner, and U. H. Koszinowski.** 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. Infec. Dis.* **133**: 399-408.
- Drew, W. L.** 1992. Cytomegalovirus infection in patients with AIDS. *Clin. Infec. Dis.* **14**: 608-615.
- Dumas, A. M., J. L. Geelen, W. Maris, and J. Van der Noordaa.** 1980. Infectivity and molecular weight of Varicella-zoster virus. *J. Gen. Virol.* **47**: 233-235.
- Ebeling, A., G. M. Keil, E. Knust, and U. H. Koszinowski.** 1983. Molecular cloning and physical mapping of murine cytomegalovirus DNA. *J. Virol.* **47**: 421-433.
- Egglestone, A. K., and S. C. West.** 1996. Exchanging partners: recombination in *E. coli*. *Trends Genet.* **12**: 20-26.
- Egglestone, A. K., and S. C. West.** 1997. Recombination initiation: easy as A, B, C, D... chi? *Curr. Biol.* **7**: 745-749.
- Ehrenhofer-Murray, A. E.** 2004. Chromatin dynamics at DNA replication, transcription and repair. *Eur. J. Biochem.* **271**: 2335-2349.

- Eikmann, M., D. Guckelkorn, and K. Radsak.** 2005. Glycoprotein Trafficking. Chapter 13 *In* Cytomegaloviruses: Molecular Biology and Immunology (M. J. Reddehase, ed.). Caister Academic Press, Hethersett, Norwich, U. K.; im Druck.
- Emery, V. C., and P. D. Griffiths.** 1990. Current status review: molecular biology of cytomegalovirus. *Int. J. Exp. Path.* **71**: 905-918.
- Epstein, M., W. Henle, B. Achoing, and Y. Barr.** 1965. Morphological and biological studies on a virus in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *J. Exp. Med.* **121**: 761-770.
- 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.
- Fraile-Ramos, A., T. N. Kledal, A. Pelchen-Matthews, K. Bowers, T. W. Schwartz, and M. Marsh.** 2001. The human cytomegalovirus US28 protein is located in endocytic vesicles and undergoes constitutive endocytosis and recycling. *Mol. Biol. Cell.* **12**: 1737-1749.
- Frenkel, N., E.C. Schirmer, L.S. Wyatt, G. Katsafanas, E. Roffmann, R.M. Danovich, and C. H. June.** 1990. Isolation of a new herpesvirus from human CD4+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 748-52.
- Fowler, K.B., F. P. McCollister, A. J. Dahle, S. Boppana, W. J. Britt, and R. F. Pass.** 1997. Progressive and fluctuating sensorineural hearing loss in children with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J. Pediatr.* **130**: 624-630.
- Gassen, H. G., und G. Schrimpf.** 1999. Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin.
- Gay, P., D. Le Coq, M. Steinmetz, E. Ferrari, and J. A. Hoch.** 1983. Cloning structural gene *SacB*, which encodes for exoenzyme levansucrase of *Bacillus subtilis*: expression of the gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **153**: 1424-1431.
- Germain, R. N.** 1994. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* **76**: 287-299.
- 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. Garcia, E. 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.
- Gold, M. C., M. W. Munks, M. Wagner, U. K. Koszinowski, A. B. Hill, and S. P. Fling.** 2002. The murine cytomegalovirus immunomodulatory gene *m152* prevents recognition of infected cells by M45-specific CTL, but does not alter the immunodominance of the M45-specific CD8 T cell response *in vivo*. *J. Immunol.* **169**: 359-365.
- Goldberg, A. L.** 2003. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* **426**: 895-899.
- Goulder, P. J., A. K. Sewell, D. G. Laloo, D. A. Price, J. A. Whelan, J. Evans, G. P. Taylor, G. Luzzi, P. Giangrande, R. E. Phillips, and A. J. McMichael.** 1997. Patterns of immunodominance in HIV-1-specific cytotoxic T lymphocyte responses in two human histocompatibility leukocyte antigens (HLA)-identical siblings with HLA-A*0201 are influenced by epitope mutation. *J. Exp. Med.* **185**: 1423-1433.
- Greaves, R. F., J. M. Brown, J. Vieira, and E. S. Mocarski, E.S.** 1995. Selectable insertion and deletion mutagenesis of the human cytomegalovirus genome using the *Escherichia coli* guanosine phosphoribosyl transferase (*gpt*) gene. *J. Gen. Virol.* **76**: 2151-2160.
- 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., J. Podlech, H. P. Steffens, S. Schmalz, and M. J. Reddehase.** 1999. In vivo replication of recombinant murine cytomegalovirus driven by the paralogous major immediate-early promoter-enhancer of human cytomegalovirus. J. Virol. **73**:5043-5055.
- 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.
- Gubbay, J., J. Collignon, P. Koopman, B. Capel, A. Economou, A. Münsterberg, N. vivian, P. Goodfellow, and R. Lovell-Badge.** 1990. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of novel family of embryonically expressed genes. Nature **346**: 245-250.
- 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.
- Hanshaw, J. B., and J. A. Dudgeon.** 1978. Congenital Cytomegalovirus. In: Viral diseases in the fetus and newborn. (A. J. Schaffner & M. Markowitz, es.) Saunders, Philadelphia, 97-152.
- Hashimoto-Gotoh, T.; F. C. Franklin, A. Nordheim, and K. N. Timmis.** 1981. Specific-purpose plasmid cloning vectors. I. Low copy number, temperature-sensitive, mobilization-defective pSC101-derived containment vectors. Gene **16**: 227-235.
- Hengartner, H., B. Odermatt, R. Schneider, M. Schreyer, G. Walle, H. R. MacDonald, and R. M. Zinkernagel.** 1988. Deletion of self-reactive T cells before entry into the thymus medulla. Nature **336**: 388-390.
- Hirt, B.** 1967. Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. J. Mol. Biol. **26**: 365-369.
- Ho, S. N., H. D. Hunt, R. M. Horton, J. K. Pullen, and L. R. Pease.** 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. Gene **77**: 51-59.
- 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.
- Holtappels, R., D. Thomas, J. Podlech, G. Geginat, H. P. Steffens, 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**: 7201-7212.
- Holtappels, R., D. Thomas, J. Podlech, G. Geginat, H. P. Steffens, and M. J. Reddehase.** 2000a. The putative natural killer decoy early gene m04 (gp34) of murine cytomegalovirus encodes an antigenic peptide recognized by protective antiviral CD8 T cells. J. Virol. **74**: 1871-1884.
- Holtappels, R., D. Thomas, and M. J. Reddehase.** 2000b. Identification of a K(d)-restricted antigenic peptide encoded by murine cytomegalovirus early gene M84. J. Gen. Virol. **81**: 3037-3042.
- Holtappels, R., M.-F. Seibert, D. Thomas, and M. J. Reddehase.** 2000c. Enrichment of immediate-early 1 (m123/pp89) peptide-specific CD8 T cells in a pulmonary CD62L(lo) memory-effector cell pool during latent murine cytomegalovirus infection of the lungs. J. Virol. **74**: 11495-11503.
- Holtappels, R., J. Podlech, N. K. A. Grzimek, D. Thomas, M.-F. Pahl-Seibert, and M. J. Reddehase.** 2001. Experimental preemptive immunotherapy of murine cytomegalovirus disease with CD8 T-cell lines specific for ppM83 and pM84, the two homologs of human cytomegalovirus tegument protein ppUL83 (pp65). J. Virol. **75**: 6584-6600.
- Holtappels, R., D. Thomas, J. Podlech, and M. J. Reddehase.** 2002a. 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.

- Holtappels, R., N. K. A. Grzimek, and M. J. Reddehase.** 2002b. Early gene m18, a novel player in the immune response to murine cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* **83**: 311-316.
- Holtappels, R., N. K. A. Grzimek, C. O. Simon, D. Thomas, D. Dreis, and M. J. Reddehase.** 2002c. Processing and presentation of murine cytomegalovirus pORFm164-derived peptide in fibroblasts in the face of all viral immunosubversive early gene functions. *J. Virol.* **76**: 6044-6053.
- Holtappels, R., J. Podlech, M.-F. Pahl-Seibert, M. Jülch, D. Thomas, C. O. Simon, M. Wagner, and M. J. Reddehase.** 2004. Cytomegalovirus misleads its host by priming of CD8 T cells specific for an epitope not presented in infected tissues. *J. Exp. Med.* **199**: 131-136.
- Holtappels, R., M. W. Munks, J. Podlech, and M. J. Reddehase.** 2005. CD8 T Cell-Based Immunotherapy of Cytomegalovirus Disease in the Mouse Model of the Immunocompromised Bone Marrow Transplantation Recipient. Chapter 19 *In Cytomegaloviruses: Molecular Biology and Immunology* (M. J. Reddehase, ed.). Caister Academic Press, Hethersett, Norwich, U. K.; im Druck.
- Honess R. W., and B. Roizman.** 1974. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *J. Virol.* **14**: 8-19.
- Horsburgh, B. C., M. M. Hubinette, D. Qiang, M. L. MacDonald, and F. Tufaro.** 1999. Allele Replacement: an application that permits rapid manipulation of herpes simplex virus type 1 genomes. *Gene Ther.* **6**: 922-930.
- 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.
- Jonjic, S., W. Mutter, F. Weiland, M. J. Reddehase, and U. H. Koszinowski.** 1989. Site-restricted persistent cytomegalovirus infection after selective long-term depletion of CD4⁺ T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **169**: 1199-1212.
- Jonjic, S., I. Bubic, and A. Krmpotic.** 2005. **Innate Immunity to Cytomegaloviruses.** Chapter 15 *In Cytomegaloviruses: Molecular Biology and Immunology* (M. J. Reddehase, ed.). Caister Academic Press, Hethersett, Norwich, U. K.; im Druck.
- Kaariainen, L., E. Klemola, and J. Paloheimo.** 1966. Rise of cytomegalovirus antibodies in an infectious mononucleosis-like syndrome after transfusion. *Br. Med. J.* **5498**:1270-1272.
- 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. Sequence and structural organization of murine cytomegalovirus immediate-early gene 1. *J. Virol.* **61**: 1901-1908.
- Kemble, G., G. Duke, R. Winter, and R. Spaete.** 1996. Defined large-scale alterations of the human cytomegalovirus genome constructed by cotransfection of overlapping cosmids *J. Virol.* **70**: 2044-2048.
- Ketner, G., F. Spencer, S. Tugendreich, C. Connelly, and P. Hieter.** 1994. Efficient manipulation of the human adenovirus genome as an infectious yeast artificial chromosome clone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 6186-6190.
- Kloetzel, P.-M.** 2004. Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII. *Nat. Immunol.* **5**: 661-669.
- Knuehl, C., P. Spee, T. Ruppert, U. Kuckelkorn, P. Henklein, J. Neefjes, and P.-M. Kloetzel.** 2001. The murine cytomegalovirus pp89 immunodominant H-2Ld epitope is generated and translocated into the endoplasmic reticulum as an 11-mer precursor peptide. *J. Immunol.* **167**: 1515-1521.
- Kobsch, S., S. Weinmann, and D. Löffert.** 2001. Optimized high-fidelity PCR with an efficient 3' → 5' exonuclease hot start. *QIAGEN News.* **4/2001**: 15-17.
- Koffron, A. J., M. Hummel, B. K. Batterson, S. Yan, D. B. Kaufman, J. P. Freyer, 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., 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.
- Korioth, F., G. G. Maul, B. Plachter, T. Stamminger, and J. Frey.** 1996. The nuclear domain 10 (ND10) is disrupted by the human cytomegalovirus gene product IE1. *Exp. Cell Res.* **229**: 155-158.
- Koszinowski U. H., M. J. Reddehase, and S. Jonjic.** 1993. The role of T-lymphocyte subsets in the control of cytomegalovirus infection. In Thomas D. B. (ed.) *Viruses and the cellular immune response*. Marcel Dekker, Inc. New York, N. Y. 429-445.
- Kurz, S. K., 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.
- 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.
- LaCava, J., J. Houseley, C. Saveanu, E. Petfalski, E. Thompson, A. Jacquier, and D. Tollervey.** 2005. RNA degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex. *Cell* **121**: 713-724.
- Landolfo, S., M. Gariglio, G. Gribaudo, and D. Lembo.** 2003. The human cytomegalovirus. *Pharmacol. Ther.* **98**: 269-297.
- 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.
- Lindl, T.** 2002. *Zell- und Gewebekultur*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin.
- Lindquister, G.J., and P.E. Pellett.** 1991. Properties of the human herpesvirus 6 strain Z29 genome: G+C content, length and the presence of variable-length directly repeated terminal sequence elements. *Virology* **182**: 102-110.
- Ljungman, P., R. De Bock, C. Cordonnier, H. Einsele, D. Engelhard, J. Grundy, A. Locasciulli, P. Reusser, and P. Ribaud.** 1993. Practices for cytomegalovirus diagnosis, prophylaxis and treatment in allogeneic bone marrow transplant recipients: a report from the Working Party for Infectious Diseases of the EBMT. *Bone Marrow Transplant.* **12**:399-403.
- Mangin, M., K. Ikeda, and A. E. Broadus.** 1990. Structure of the mouse gene encoding parathyroid hormone-related peptide. *Gene* **95**: 195-202.
- 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.** 1988. Replication of the murine cytomegalovirus genome: structure and role of the termini in the generation and cleavage of concatamers. *Virology* **162**: 98-107.
- Marrack, P., and J. Kappler.** 1987. The T cell receptor. *Science* **238**: 1073-1079.
- Matloubian, M., T. Somasundaram, S. R. Kolhekar, R. Selvakumar, and R. Ahmed.** 1990. Genetic basis of viral persistence: single amino acid change in the viral glycoprotein affects ability of lymphocytic choriomeningitis virus to persist in adult mice. *J. Exp. Med.* **172**: 1043-1048.
- McLeod, 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.

- McVoy, M. A., and S. P. Adler.** 1994. Human cytomegalovirus DNA replicates after early circularization by concatemer formation, and inversion occurs within the concatemer. *J. Virol.* **68**: 1040-1051.
- Menard, 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**: 5557-5570.
- Mercer, J. A., J. R. Marks, and D. H. Spector.** 1983. Molecular cloning and restriction endonuclease mapping of the murine cytomegalovirus genome (Smith Strain). *Virology* **129**: 94-106.
- 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 infections. *J. Virol.* **62**: 987-997.
- 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.
- Messerle, M., B. Bühler, G. M. Keil, and U. H. Koszinowski.** 1992. Structural organization, expression, and functional characterization of the murine cytomegalovirus immediate-early gene 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.
- Meyers, J. D.** 1985. Cytomegalovirus infection after organ allografting; prospects for immunoprophylaxis. In: *The Herpesvirus* (B. Roizman & C. Lopez, eds.) Plenum Press New York & London, Vol **4**: 201-227.
- Miyahira, Y., K. Murata, D. Rodriguez, J. R. Rodriguez, M. Esteban, M. M. Rodrigues, and F. Zavala** 1995. Quantification of antigen specific CD8+ T cells using an ELISPOT assay. *J. Immunol. Methods* **181**: 45-54.
- Mocarski, E. S., and G. W. Kemble.** 1996. Recombinant cytomegaloviruses for study of replication and pathogenesis. *Intervirology* **39**: 320-330.
- Mocarski, E.S., and C. T. Courcelle.** 2001. Cytomegalovirus and Their Replication. In *Fields Virology*^{4th} Edition. Vol. **2**: 2629-2673.
- Mocarski, E. S., G. Hahn, K. Lofgren White, J. Xu, B. Slobedman, L. Hertel, S. A. Aguirre, and S. Noda.** 2005. Myeloid cell recruitment and function in pathogenesis and latency. Chapter 22 *In* *Cytomegaloviruses: Molecular Biology and Immunology* (M. J. Reddehase, ed.). Caister Academic Press, Hethersett, Norwich, U. K.; im Druck.
- Momburg, F., J. Roelse, G. J. Hammerling, and J. J. Neefjes.** 1994. Peptide size selection by the major histocompatibility complex-encoded peptide transporter. *J Exp Med.* **179**:1613-1623.
- Morello, C. S., Y. Ming, and D. H. Spector.** 2002. Development of a vaccine against murine cytomegalovirus (MCMV), consisting of plasmid DNA and formalin-inactivated MCMV, that provides long-term, complete protection against viral replication. *J. Virol.* **76**: 4822-4835.
- Moskophidis, D., and R. M. Zinkernagel.** 1995. Immunobiology of cytotoxic T-cell escape mutants of lymphocytic choriomeningitis virus. *J. Virol.* **69**: 2187-2193.
- Moskowitz L., G. T. Hensley, J. C. Chan, and K. Adams.** 1985. Immediate causes of death in acquired immunodeficiency syndrome. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **109**: 735-738.
- Mothe, B. R., H. Horton, D. K. Carter, T. M. Allen, M. E. Liebl, P. Skinner, T. U. Vogel, S. Fuenger, K. Vielhuber, W. Rehrauer, N. Wilson, G. Franchini, J. D. Altman, A. Haase, L. J. Picker, D. B. Allison, and D. I. Watkins.** 2002. Dominance of CD8 responses specific for epitopes bound by a single major histocompatibility complex class I molecule during the acute phase of viral infection. *J. Virol.* **76**: 875-884.
- Mullis, K. B., and F. A. Faloona.** 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**: 335-350.

- 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.
- Murphy, E., I. Rigoutsos, T. Shibuya, and T. E. Shenk.** 2003a. Reevaluation of human cytomegalovirus coding potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 13585-13590.
- 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.
- Neimann, P. E., W. Reeves, G. Ray, N. Flournoy, K. G. Lerner, G. E. Sale, and E. D. Thomas.** 1977. A prospective analysis of interstitial pneumonia and opportunistic viral infections among recipients of allogeneic bone marrow grafts. *J. Infect. Dis.* **136**: 754-767.
- Nevels, M., C. Paulus, and T. Shenk.** 2004. Human cytomegalovirus immediate-early 1 protein facilitates viral replication by antagonizing histone deacetylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 17234-17239.
- Nowak, M. A., R. M. May, R. E. Phillips, S. Rowland-Jones, D. G. Laloo, S. McAdam, P. Klenerman, B. Koppe, K. Sigmund, and C. R. Bangham.** 1995. Antigenic oscillations and shifting immunodominance in HIV-1 infections. *Nature* **375**: 606-611.
- O'Connor, M., M. Pfeifer, and W. Bender.** 1989. Construction of large DNA segments in *Escherichia coli*. *Science*. **244**: 1307-1312.
- Ojala, P.M., B. Sodeik, M. W. Ebersold, U. Kutay, and A. Helenius.** 2000. Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex *in vitro*. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 4922-4931.
- 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.
- Plummer, G.** 1967. Comparative virology of the herpes group. *Proc. Med. Virol.* **9**: 302-340.
- Pierce, J. C., B. Sauer, and N. Sternberg.** 1992. A positive selection vector for cloning high molecular weight DNA by the bacteriophage P1 system: improved cloning efficacy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 2056-2060.
- 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 histopathology after bone marrow transplantation. *J. Gen. Virol.* **79**: 2099-2104.
- Podlech, J., R. Holtappels, M.-F. Pahl-Seibert, H. P. Steffens, and M. J. Reddehase.** 2000. Murine model of cytomegalovirus interstitial pneumonia in syngeneic bone marrow transplantation: persistence of protective pulmonary CD8-T-cell infiltrates after clearance of acute infection. *J. Virol.* **74**: 7496-7507.
- Polic, B., H. Hengel, A. Krmpotic, J. Trgovcich, I. Pavic, P. Lucin, S. Jonjic, and U. H. Koszinowski.** 1998. Hierarchical and redundant lymphocyte subset control precludes cytomegalovirus replication during latent infection. *J. Exp. Med.* **21**: 1047-1054.
- Pollock, J. L., R. M. Presti, S. Paetzold, and H. W. Virgin IV.** 1997. Latent murine cytomegalovirus infection in macrophages. *Virology*. **227**: 168-179.
- 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.
- Radsak, K., K. H. Brücher, W. Britt, H. Shiou, D. Schneider, and A. Kollert.** 1990. Nuclear compartmentation of glycoprotein B of human cytomegalovirus. *Virology* **177**: 515-522.

- Raijmakers, R., G. Schilders, and G. J. Pruijn.** 2004. The exosome, a molecular machine for controlled RNA degradation in both nucleus and cytoplasm. *Eur. J. Cell. Biol.* **83**: 175-183.
- Rammensee, H. G.** 1995. Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. *Curr. Opin. Immunol.* **7**: 85-96.
- Ramsay, M.** 1994. Yeast artificial chromosome cloning. *Mol. Biotechnol.* **1**: 181-201.
- 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., and U. H. Koszinowski.** 1984. Significance of herpesvirus immediate early gene expression in cellular immunity to cytomegalovirus infection. *Nature* **311**: 369-371.
- 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.
- Reddehase, M. J., W. Mutter, K. Münch, H. J. Buhning, 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., S. Jonjic, F. Weiland, W. Mutter, and U. H. Koszinowski.** 1988. Adoptive immunotherapy of murine cytomegalovirus adenitis in the immunocompromised host: CD4-helper-independent antiviral function of CD8-positive memory T lymphocytes derived from latently infected donors. *J. Virol.* **62**: 1061-1065.
- Reddehase, M. J., and H. Kalbacher.** 1989. Role of individual amino acid side chains in the binding of antigenic peptides to their MHC class I glycoprotein receptor. *Proceedings of MoBBEL. 4th International Autumn Meeting, Tannheim, Austria* **4**: 45-49.
- 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., and U. H. Koszinowski.** 1991. Redistribution of critical major histocompatibility complex and T cell receptor-binding functions of residues in an antigenic sequence after biterminal substitution. *Eur. J. Immunol.* **21**: 1697-1701.
- Reddehase, M. J., M. Baltesen, M. Rapp, S. Jonjic, I. Pacic, and U. H. Koszinowski.** 1994. The conditions of primary infection 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.** 2000. The immunogenicity of human and murine cytomegalovirus. *Curr. Opin. Immunol.* **12**: 390-396.
- Reddehase, M. J., J. Podlech, and N. K. A. Grzimek.** 2002. Mouse models of cytomegalovirus latency: overview. *J. Clin. Virol.* **25**: Suppl. 2 23-36.
- Reddehase, M. J.** 2002. Antigens and immunoevasins: opponents in cytomegalovirus immune surveillance. *Nat. Rev. Immunol.* **2**: 831-844.
- Reinke, P., S. Proesch, F. Kern, and H. D. Folk.** 1999. Mechanisms of human cytomegalovirus (HCMV) (re)activation and its impact on organ transplant patients. *Transpl. Infect. Dis.* **1**: 157-164.
- Reeves, M. B., P. A. MacAry, P. J. Lehner, J. G. Sissons, and J. H. Sinclair.** 2005. Latency, chromatin remodeling, and reactivation of human cytomegalovirus in the dendritic cells of healthy carriers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 4140-4145.
- Reusser, P., S. R. Riddell, J. D. Meyers, and P. D. Greenberg.** 1991. Cytotoxic T-cell lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood.* **78**: 1373-1380.

- Riddel, S. R., K. S. Watanabe, J. M. Goodrich, C. R. Li, M. E. Gaha, and P. D. Greenberg.** 1992. Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by adoptive transfer of T-cell clones. *Science*. **257**: 238-241.
- Rock, K. L., I. A. York, T. Saric, and A. L. Goldberg.** 2002. Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides. *Adv. Immunol.* **80**: 1-70.
- Rock, K. L., I. A. York, T. and A. L. Goldberg.** 2004. Post-proteasomal antigen processing for major histocompatibility complex class I presentation. *Nat. Immunol.* **5**: 670-677.
- Rognan, D., M. J. Reddehase, U. H. Koszinowski, and G. Folkers.** 1992. Molecular modeling of an antigenic complex between a viral peptide and a class I major histocompatibility glycoprotein. *Proteins*. **13**: 70-85.
- Roizman, B., and W. Batterson.** 1986. Herpesvirus and their replication. *In: Fundamental Virology* (Fields, B. N. & D. M. Knipe, eds.) Raven Press, New York: 607-636.
- Roizman, B., and A. E. Sears.** 1987. An inquiry into the mechanisms of herpes simplex virus latency. *Ann. Rev. Microbiol.* **41**: 543-571.
- Roizman, B., and J. Baines.** 1991. The diversity and unity of Herpesviridae. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **14**: 63-79.
- Roizman, B., R. C. Desrosiers, B. Fleckenstein, C. Lopez, A. C. Minson, and M. J. Studdert.** 1992. The family Herpesviridae: an update. *Arch. Virol.* **123**: 425-449.
- Roizman, B., and E. P. Pellett.** 2001. The Family Herpesviridae: A Brief Introduction. *In: Fields Virology* 4th Edition. **Vol. 2**: 2381-2397.
- Saeki, Y., T. Ichikawa, A. Saeki, E. A. Chiocca, K. Tobler, M. Ackermann, X. O. Breakefield, and C. Fraefel.** 1998. Herpes simplex virus type 1 DNA amplified as bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*: rescue of replication-competent virus progeny and packaging of amplicon vectors. *Hum. Gene Ther.* **9**: 2787-2794.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich.** 1988. Primer directetd enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. **239**: 487-491.
- Sakaguchi, S.** 2000. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell*. **101**: 455-458.
- Sambrook J., and D. W. Russel.** 2001. *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, N. Y..
- Saric, T., J. Beninga, C. I. Graef, T. N. Akopian, K. L. Rock, and A. L. Goldberg.** 2001. Major histocompatibility complex class I-presented antigenic peptides are degraded in cytosolic extracts primarily by thimet oligopeptidase. *J. Biol. Chem.* **276**: 36476-36481.
- Saric T, S. C. Chang, A. Hattori, I. A. York, S. Markant, K. L. Rock, M. Tsujimoto, and A. L. Goldberg.** 2002. An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat. Immunol.* **3**: 1169-1176.
- Sarov, I., and I. Abady.** 1975. The morphogenesis of human cytomegalovirus. Isolation and polypeptide characterization of cytomegalovirions and dense bodies. *Virology* **66**: 464-473.
- Schalkwyk, L. C., F. Francis, and H. Lehrach.** 1995. Techniques in mammalian genome mapping. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**: 37-43.
- Schneweis, K. E.** 1962. Serologische Untersuchungen zur Typendifferenzierung des Herpesvirus Hominis. *Z. Immunitätsforsch. Exp. Ther.* **124**: 24-48.
- Selin, L. K., M. Cornberg, M. A. Brehm, S. K. Kim, C. Calcagno, D. Gherzi, R. Puzone, F. Celada, and R. M. Welsh.** 2004. CD8 memory T cells: cross-reactivity and heterologous immunity. *Semin. Immunol.* **16**: 335-347.

- Serwold, T., F. Gonzalez, J. Kim, R. Jacob, and N. Shastri.** 2002. ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature*. **419**: 443-445.
- Sheng, Y., V. Mancino, and B. Birren.** 1995. Transformation of *Escherichia coli* with large DNA molecules by electroporation. *Nucleic Acids Res.* **23**: 1990-1996.
- Shizuya, H., B. Birren, U. J. Kim, V. Mancino, T. Slepak, Y. Tachiiri, and M. Simon.** 1992. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 8794-8797.
- Simon, C. O., C. K. Seckert, D. Dreis, M. J. Reddehase, and N. K. A. Grzimek.** 2005a. 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.** 2005b. Murine Model of Cytomegalovirus Latency and Reactivation: The Silencing/Desilencing and Immune Sensing Hypothesis. Chapter 23 *In* Cytomegaloviruses: Molecular Biology and Immunology (M. J. Reddehase, ed.). Caister Academic Press, Hethersett, Norwich, U. K.; im Druck.
- Singh, N., J. S. Dummer, S. Kusne, M. K. Breinig, J. A. Armstrong, L. Makowk, T. E. Strazl, and M. Ho.** 1988. Infections with cytomegalovirus and other herpesviruses in 121 liver transplant recipients: Transmission by donated organ and effect of OKT3 antibodies. *J. Infect. Dis.* **158**: 124-131.
- Slobedman, B., and E. S. Mocarski.** 1999. Quantitative analysis of latent human cytomegalovirus. *J. Virol.* **73**: 4806-4812.
- Smith, G. A., and Enquist L. W.** 1999. Construction and transposon mutagenesis in *Escherichia coli* of a full-length infectious clone of pseudorabies virus, an alphaherpesvirus. *J. Virol.* **73**: 6405-6414.
- Smith, G. R.** 1988. Homologous recombination in prokaryotes [published erratum in *Microbiol Rev* 1988 Jun; 52(2):304]. *Microbiol. Rev.* **52**: 1-28.
- 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**: 224-230.
- Sodeik, B., M. W. Ebersold, and A. Helenius.** 1997. Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J. Cell. Biol.* **136**: 1007-1021.
- Southern, E. M.** 1975. Detecting of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **99**: 503-517.
- Spaete, R. R., and E. S. Mocarski.** 1987. Insertion and deletion mutagenesis of the human cytomegalovirus genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 7213-7217.
- Stangow, S., R. F. Pass, M.E. Dworsky, R. E. Henderson, E. G. Moore, P. D. Walton, and C. A. Alford.** 1982. Congenital cytomegalovirus infection. The relative importance of primary and recurrent maternal infection. *N. Engl. J. Med.* **306**: 945-949.
- Stangow, S., and R. Whitley.** 1985. Herpesvirus infections of pregnancy. Part. I: Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infections. *N. Engl. J. Med.* **313**: 1270-1274.
- Stavropoulos, T. A., and C. A. Strathdee.** 1998. An enhanced packaging system for helper-dependent herpes simplex virus vectors. *J. Virol.* **72**: 7137-7143.
- Steffens, H. P., S. Kurz, R. Holtappels, and M. J. Reddehase.** 1998. Preemptive CD8-T-cell immunotherapy of acute cytomegalovirus infection prevents lethal disease, limits the burden of latent viral genome, and reduces the risk of virus recurrence. *J. Virol.* **72**: 1797-1804.
- Steinmetz, M., D. Le Coq, H. B. Djemia, and P. Gay.** 1983. [Genetic analysis of *sacB*, the structural gene of a secreted enzyme, levansucrase of *Bacillus subtilis* Marburg]. *Mol. Gen. Genet.* **191**: 138-144.
- Streblov, D. N. and J. A. Nelson.** 2003. Models of HCMV latency and reactivation. *Trends Microbiol.* **11**: 293-295.

- Streblow, D. N., S. Varnum, R. Smith, and J. A. Nelson.** 2005. A Proteomics Analysis of Human Cytomegalovirus Particles. Chapter 5 *In Cytomegaloviruses: Molecular Biology and Immunology* (M. J. Reddehase, ed.). Caister Academic Press, Hethersett, Norwich, U. K., im Druck.
- 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.
- Taguchi, T., J. R. McGhee, R. L. Coffman, K. W. Beagley, J. H. Eldrige, K. Takatsu, and H. Kiyono** 1990. Detection of individual mouse splenic T cells producing IFN-gamma and IL-5 using the enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay. *J. Immunol. Methods* **128**: 65-73.
- Tang, M. X., C. T. Redemann, and F. C. Szoka Jr.** 1996. *In vitro* gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers. *Bioconjug. Chem.* **7**: 703-714.
- Tang, M. X., and F. C. Szoka Jr.** 1997. The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes. *Gene Therapy.* **4**: 823-832.
- Tang, Q., and G. G. Maul.** 2003. Mouse cytomegalovirus immediate-early protein 1 binds with host cell repressors to relieve suppressive effects on viral transcription and replication during lytic infection. *J. Virol.* **77**: 1357-1367.
- Tang, Q., and G. G. Maul.** 2005. Immediate Early Interactions and Epigenetic Defense Mechanisms. Chapter 7 *In Cytomegaloviruses: Molecular Biology and Immunology* (M. J. Reddehase, ed.). Caister Academic Press, Hethersett, Norwich, U. K., im Druck.
- Taylor, W. R.** 1986. The Classification of Amino Acid Conservation. *J. Theor. Biol.* **119**: 205-218.
- Thaele, R., U. Szepan, H. Hengel, G. Geginat, P. Lucin, and U. H. Koszinowski.** 1996. Identification of the mouse cytomegalovirus genomic region affecting major histocompatibility complex class I molecule transport. *J. Virol.* **69**: 6098-6105.
- 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.
- Van der Most, R. G., A. Sette, C. Oseroff, J. Alexander, K. Murali-Krishna, L. L. Lau, S. Southwood, J. Sidney, R. W. Chesnut, M. Matioubian, and R. Ahmed.** 1996. Analysis of cytotoxic T cell responses to dominant and subdominant epitopes during acute and chronic lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J. Immunol.* **157**: 5543-5554.
- Van der Most, R. G., K. Murali-Krishna, J. G. Lanier, E. J. Wherry, M. T. Puglielli, J. N. Blattman, A. Sette, and R. Ahmed.** 2003. Changing immunodominance patterns in antiviral CD8 T-cell responses after loss of epitope presentation or chronic antigenic stimulation. *Virology* **315**: 93-102.
- 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.
- Vermaak, D., K. Ahmad, and S. Henikoff.** 2003. Maintenance of chromatin states: an open-and-shut case. *Curr Opin Cell Biol.* **15**: 266-274.
- Vieira, J., H. E. Farrell, W. D. Rawlinson, and E. S. Mocarski.** 1994. Genes in the HindIII J fragment of the murine cytomegalovirus genome are dispensable for growth in cultured cells: insertion mutagenesis with a lacZ/gpt cassette. *J. Virol.* **68**: 4837-4846.
- 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., A. Gutermann, J. Podlech, M. J. Reddehase, and U. H. Koszinowski.** 2002. Major histocompatibility complex class I allele-specific cooperative and competitive interactions between immune evasion proteins of cytomegalovirus. *J. Exp. Med.* **196**: 805-916.
- Wagner, M., and U. H. Koszinowski.** 2004. Mutagenesis of viral BACs with linear PCR fragments (ET recombination). *Methods in Mol. Biol.* **256**: 257-268.
- Walter, E. A., P. D. Greenberg, M. J. Gilbert, R. J. Finch, K. S. Watanabe, E. D. Thomas, and S. R. Riddell.** 1995. Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N. Engl. J. Med.* **333**: 1038-1044.
- 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.
- Webb J. R., S. H. Lee, and S. M. Vidal.** 2002. Genetic control of innate immune responses against cytomegalovirus: MCMV meets its match. *Genes Immun.* **3**: 250-262.
- Webby, R. J., S. Andreansky, J. Stambas, J. E. Rehg, R. G. Webster, P. C. Doherty, and S. J. Turner.** 2003. Protection and compensation in the influenza virus-specific CD8+ T cell response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 7235-7240.
- Weiland, F., G. M. Keil, M. J., Reddehase, and U. H. Koszinowski.** 1986. Studies on the morphogenesis of murine cytomegalovirus. *Intervirology.* **26**: 192-201.
- Weller, T. H., J. B. Hanshaw, and D. E. Scott.** 1960. Serology differentiation of viruses responsible for cytomegalic inclusion disease. *Virology.* **12**: 130-132.
- White, K. L., B. Slobedman, and E. S. Mocarski.** 2000. Human cytomegalovirus latency-associated protein pORF94 is dispensible for productive and latent infection. *J. Virol.* **74**: 9333-9337.
- Wilfinger, W. W., M. Mackey, and P. Chomczynski.** 1997. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Bio Techniques.* **22**: 474.
- Wilkinson, G.W., C. Kelly, J. H. Sinclair, and C. Rickards.** 1998. Disruption of PML-associated nuclear bodies mediated by the human cytomegalovirus major immediate early gene product. *J. Gen. Virol.* **79**: 1233-1245.
- Wilson I.A., H. L. Niman, R. A. Houghten, A. R. Cherenson, M. L. Connolly, and R. A. Lerner.** 1984. The structure of an antigenic determinant in a protein. *Cell.* **37**: 767-378.
- Wolff, D., G. Jahn, and B. Plachter.** 1993. Generation and effective enrichment of selectable human cytomegalovirus mutants using site-directed insertion of the neo gene. *Gene* **130**: 167-173.
- York, I. A., S. C. Chang, T. Saric, J. A. Keys, J. M. Favreau, A. L. Goldberg, and K. L. Rock.** 2002. The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues. *Nat. Immunol.* **3**: 1177-1184.
- Yow, D. M.** 1989. Congenital cytomegalovirus diseases: a new problem. *J. Infec. Dis.* **159**: 163-167.
- Yewdell, J. W., and J. R. Bennink.** 1999. Immunodominance in major histocompatibility complex class I-restricted T lymphocyte responses. *Annu. Rev. Immunol.* **17**: 51-88.
- Yuhasz, S. A., V. B. Disette, M. L. Cook, and J. G. Stevens.** 1994. Murine cytomegalovirus is present in both chronic active and latent states in persistently infected mice. *Virology.* **2002**: 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 restriction endonuclease recognition sites on PCR products. *Biotechniques* **4**: 582-584.

6 Anhang

6.1 Lineare Regression mit Mathematica V4.2.1 Statistik-Software

```
<<Statistics`LinearRegression`
```

```
Set::write: Tag Regress in Options[Regress] is Protected.
```

```
Set::write: Tag DesignedRegress in Options[DesignedRegress] is Protected.
```

```
Set::write: Tag DesignMatrix in Options[DesignMatrix] is Protected.
```

```
General::stop: Further output of Set::write will be suppressed during this calculation.
```

```
SetDelayed::write: Tag Regress in Regress[data_,basis_,vars_,options___Rule] is Protected.
```

```
SetDelayed::write: Tag DesignMatrix in DesignMatrix[data_,basis_,vars_,opts___Rule] is Protected.
```

```
SetDelayed::write: Tag DesignedRegress in  
DesignedRegress[designMatrix_?MatrixQ,response_?VectorQ,options___Rule] is Protected.
```

```
General::stop: Further output of SetDelayed::write will be suppressed during this calculation.
```

```
<<Graphics`MultipleListPlot`
```

```
SetDirectory["D:\Simon\Eli\Eli93"];
```

Verzeichnisbaum der Daten, einfache Namen vergeben! Maximal 4 Unterverzeichnisse!

```
datenName="ml64LnachA.txt";
```

Dateiname der txt-Datei im Unterverzeichnis ...Eli93"; txt-Datei muss zuvor in Excel als txt-Format durch Tabstops getrennt abgespeichert werden!

```
Off[DesignedRegress::tsos]
```

```
datenString=StringReplace[First[ReadList[datenName,String,RecordLists→True]],{"."→","  
","→"."","\r"→"}];
```

```
anzahl=Length[StringPosition[datenString[[1]],"\t"]]+1;
```

```
lesenVomString=First[ReadList[StringToStream[#],Table[Number,{anzahl}]]]&;
```

```
data=Map[Take[lesenVomString[#],2]&,datenString];
```

```
gewichte=Transpose[Map[Take[lesenVomString[#],-1]&,datenString]];
```

```
reg=Regress[data,{x},x,Weights→gewichte[[1]],IncludeConstant→False,  
RegressionReport→{BestFitParameters,ANOVATable,ParameterCITable}];
```

```
Steigung=(BestFitParameters /. reg)[[1]];
```

```
Konfidenzuntergrenze=(ParameterCITable /. reg)[[1]][[1]][[3]][[1]];
```

```
Konfidenzobergrenze=(ParameterCITable /. reg)[[1]][[1]][[3]][[2]];
```

```
P=(ANOVATable /. reg)[[1]][[1]][[5]];
```

```
xval=Map[First,data];
```

```

Regressfunktion[x_] := Steigung * x;
ObergrenzeFunktion[x_] := Konfidenzobergrenze * x;
UntergrenzeFunktion[x_] := Konfidenzuntergrenze * x;

yvalOben = ObergrenzeFunktion[xval];
yvalUnten = UntergrenzeFunktion[xval];
yvalOptimal = Regressfunktion[xval];

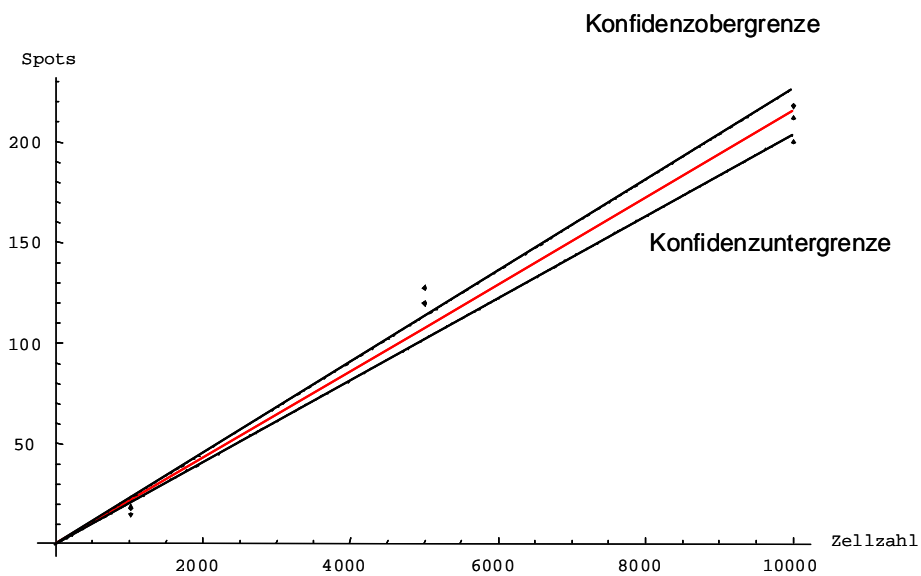
predicted = Prepend[Transpose[{xval,yvalOptimal}],{0,0}];

lowerCI = Prepend[Transpose[{xval,yvalUnten}],{0,0}];
upperCI = Prepend[Transpose[{xval,yvalOben}],{0,0}];

MultipleListPlot[data,predicted,lowerCI,upperCI,SymbolShape→{PlotSymbol[Diamond],None,
None,None},PlotJoined→{False,True,True,True},PlotStyle→{Automatic,Automatic,Dashing[.0
03,.005]},Dashing[.003,.005]},AxesLabel→{"Zellzahl","Spots"}]

```

-Graphics-



Steigung
0.0214749

Konfidenzuntergrenze
0.0203364

Konfidenzobergrenze
0.0226135

P
 8.61362×10^{-11}

[Auswertung starten:](#) Menü: Kernel → Evaluation → Evaluate Notebook

6.2 Konfidenzintervalle und p-Werte aller *ELISpot*-Daten

6.2.1 *ELISpot*-Daten für Kapitel 3.9.1

mCMV-IE1-L176A					mCMV-IE1-A176L*			
Peptid	<i>upper</i>	<i>MPN</i>	<i>lower</i>	P-Wert	<i>upper</i>	<i>MPN</i>	<i>lower</i>	P-Wert
α CD3 ϵ	0,0462	0,0381	0,0299	$4,8 \times 10^{-6}$	0,0868	0,078	0,0692	$3,4 \times 10^{-8}$
\emptyset Peptid	0,0055	0,0045	0,0033	$7,3 \times 10^{-4}$	0,0031	0,0019	0,0007	$1,6 \times 10^{-2}$
m164	0,0134	0,0124	0,0114	$6,1 \times 10^{-7}$	0,0104	0,0095	0,0087	$7,7 \times 10^{-7}$
IE1-L	0,0047	0,0033	0,0019	$4,8 \times 10^{-3}$	0,0116	0,0103	0,0091	$4,1 \times 10^{-6}$
IE1-A	0,0069	0,049	0,0028	$2,7 \times 10^{-3}$	0,0036	0,0024	0,0011	$4,8 \times 10^{-3}$
IE1-F	0,0077	0,0061	0,0046	$1,6 \times 10^{-4}$	0,0137	0,0111	0,0085	$1,2 \times 10^{-4}$

Tab. 6.1 T-Zell Frequenzen von akut mit mCMV-IE1-L176A bzw. mCMV-IE1-A176L* infizierten BALB/c.

mCMV-IE1-L176A					mCMV-IE1-A176L*			
Peptid	<i>upper</i>	<i>MPN</i>	<i>lower</i>	P-Wert	<i>upper</i>	<i>MPN</i>	<i>lower</i>	P-Wert
α CD3 ϵ	0,0498	0,0475	0,0453	$4,1 \times 10^{-8}$	0,0242	0,0229	0,0218	1×10^{-7}
\emptyset Peptid	0,0029	0,0024	0,0019	$7,1 \times 10^{-6}$	0,0019	0,0015	0,0012	$7,6 \times 10^{-6}$
m164	0,0226	0,0215	0,0203	$8,6 \times 10^{-11}$	0,0091	0,0084	0,0077	$3,8 \times 10^{-9}$
IE1-L	0,0020	0,0015	0,0010	$1,9 \times 10^{-4}$	0,0100	0,0089	0,0079	$3,4 \times 10^{-8}$
IE1-A	0,0021	0,0017	0,0013	$1,6 \times 10^{-5}$	0,0015	0,0012	0,0008	$1,1 \times 10^{-4}$
IE1-F	0,0022	0,0017	0,0012	6×10^{-5}	0,0120	0,0108	0,0096	$2,3 \times 10^{-8}$

Tab. 6.2 T-Zell Frequenzen von Memory Milzzellen aus mCMV-IE1-L176A bzw. mCMV-IE1-A176L* infizierten BALB/c.

6.2.2 ELISpot-Daten für Kapitel 3.9.2

mCMV-BAC-WT					Doppelmutante			
Peptid	<i>upper</i>	<i>MPN</i>	<i>lower</i>	P-Wert	<i>upper</i>	<i>MPN</i>	<i>lower</i>	P-Wert
α CD3 ϵ	0,0417	0,0389	0,0361	$3,3 \times 10^{-7}$	0,0843	0,0634	0,0425	$5,8 \times 10^{-3}$
Ø Peptid	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	0,0004	0,0003	0,0002	4×10^{-6}
IE1	0,0071	0,0067	0,0064	$1,9 \times 10^{-13}$	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
m164	0,0070	0,0065	0,0061	$3,2 \times 10^{-12}$	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
M18	0,0015	0,0013	0,0011	1×10^{-8}	0,0023	0,0022	0,002	$1,2 \times 10^{-12}$
M83	0,0011	0,0010	0,0010	$9,7 \times 10^{-14}$	0,0008	0,0007	0,0005	$5,6 \times 10^{-7}$
m04	0,0013	0,0010	0,0008	$8,2 \times 10^{-7}$	0,001	0,0009	0,0008	$5,2 \times 10^{-10}$
M45	0,0002	0,0002	0,0002	$9,7 \times 10^{-9}$	0,0005	0,0004	0,0003	$2,6 \times 10^{-8}$
M84	0,0004	0,0003	0,0002	$1,2 \times 10^{-5}$	0,0003	0,0002	0,0002	1×10^{-5}

mCMV-IE-L176A					mCMV-m164-A265I			
Peptid	<i>upper</i>	<i>MPN</i>	<i>lower</i>	P-Wert	<i>upper</i>	<i>MPN</i>	<i>lower</i>	P-Wert
α CD3 ϵ	0,0614	0,0606	0,0599	$4,4 \times 10^{-11}$	0,0324	0,03	0,0276	$5,3 \times 10^{-7}$
Ø Peptid	0,0003	0,0003	0,0002	$3,1 \times 10^{-14}$	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
IE1	0,0008	0,0006	0,0005	$1,2 \times 10^{-6}$	0,0096	0,0088	0,008	$5,2 \times 10^{-9}$
m164	0,0099	0,0095	0,009	$8,5 \times 10^{-14}$	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
M18	0,0019	0,0016	0,0014	$1,8 \times 10^{-8}$	0,0019	0,0018	0,0016	$3,0 \times 10^{-11}$
M83	0,0004	0,0003	0,0003	$1,4 \times 10^{-6}$	0,0004	0,0003	0,0001	$5,2 \times 10^{-4}$
m04	0,001	0,0008	0,0007	$2,5 \times 10^{-7}$	0,0005	0,0004	0,0003	$2,4 \times 10^{-7}$
M45	0,0005	0,0004	0,0004	$1,2 \times 10^{-8}$	0,0003	0,0002	0,0002	$7,2 \times 10^{-8}$
M84	0,0003	0,0003	0,0002	$7,8 \times 10^{-7}$	0,0002	0,0001	0,0001	$2,3 \times 10^{-4}$

Tab. 6.3 T-Zell Frequenzen aus akut mit mCMV-BAC-WT, Doppelmutante, mCMV-IE1-L176A bzw. mCMV-m164-I265A infizierten BALB/c. n. b.: nicht berechnet.

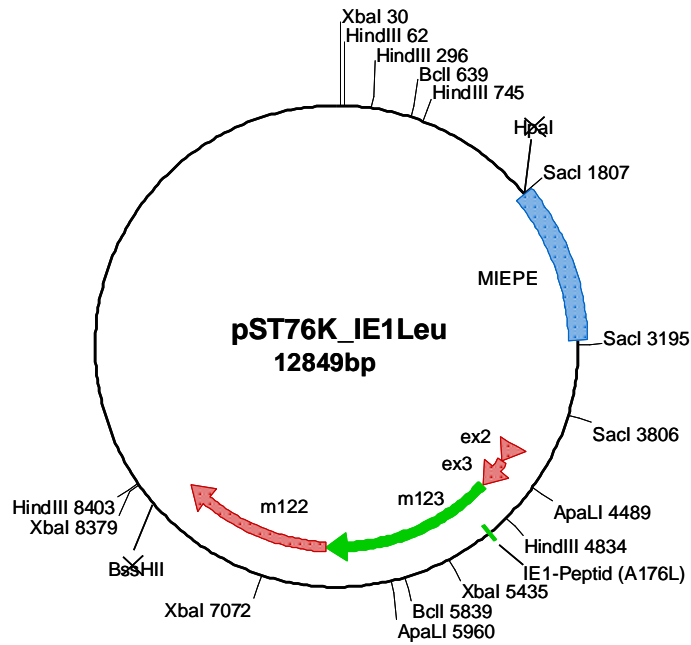
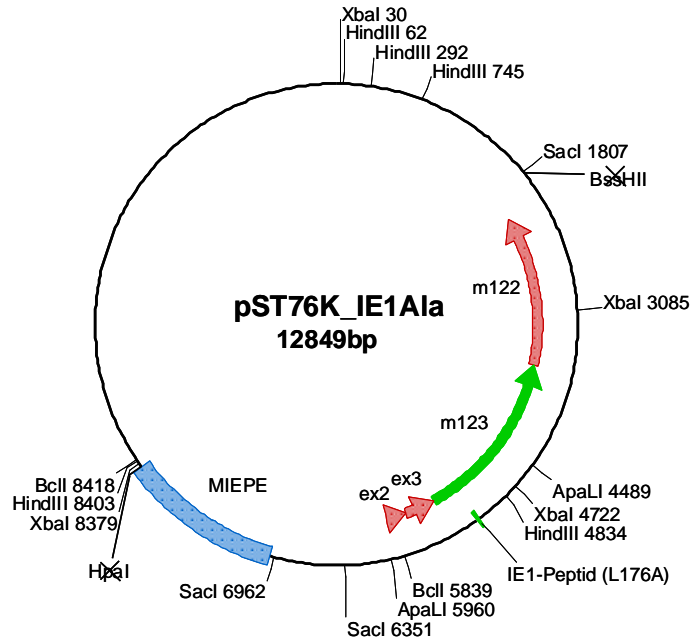
mCMV-BAC-WT					Doppelmutante			
Peptid	<i>upper</i>	<i>MPN</i>	<i>lower</i>	P-Wert	<i>upper</i>	<i>MPN</i>	<i>lower</i>	P-Wert
α CD3 ϵ	0,1183	0,1068	0,0952	$2,5 \times 10^{-6}$	0,1083	0,0935	0,0788	$1,6 \times 10^{-5}$
Ø Peptid	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
IE1	0,0044	0,0042	0,0039	728×10^{-13}	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
m164	0,006	0,0058	0,0056	$2,2 \times 10^{-15}$	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
M18	0,0009	0,0009	0,0008	$3,3 \times 10^{-16}$	0,0023	0,0022	0,0021	$2,5 \times 10^{-14}$
M83	0,0005	0,0005	0,0004	$4,4 \times 10^{-10}$	0,0005	0,0004	0,0003	$1,6 \times 10^{-6}$
m04	0,0003	0,0003	0,0002	$9,9 \times 10^{-10}$	0,0007	0,0007	0,0006	2×10^{-11}
M45	0,0004	0,0004	0,0003	$1,2 \times 10^{-9}$	0,0006	0,0005	0,0004	$7,7 \times 10^{-8}$
M84	0,0001	0,0001	0,0001	$1,3 \times 10^{-7}$	0,0004	0,0004	0,0003	$2,6 \times 10^{-7}$

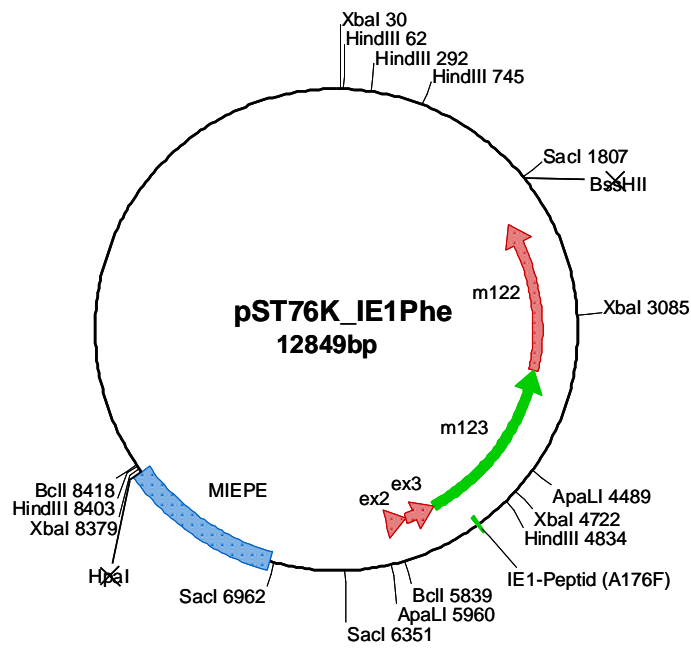
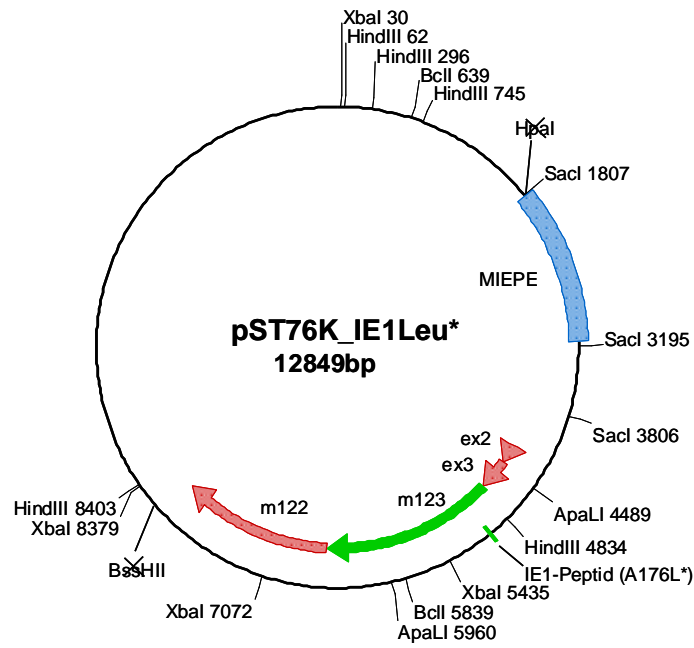
mCMV-IE-L176A					mCMV-m164-A265I			
Peptid	<i>upper</i>	<i>MPN</i>	<i>lower</i>	P-Wert	<i>upper</i>	<i>MPN</i>	<i>lower</i>	P-Wert
α CD3 ϵ	0,1081	0,0963	0,0845	$4,5 \times 10^{-6}$	0,1132	0,0991	0,0849	$9,7 \times 10^{-6}$
Ø Peptid	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
IE1	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	0,0052	0,0049	0,0045	$6,2 \times 10^{-12}$
m164	0,0076	0,0075	0,0073	$< 1 \times 10^{-14}$	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
M18	0,0019	0,0018	0,0017	$3,9 \times 10^{-12}$	0,0018	0,0017	0,0016	$6,6 \times 10^{-12}$
M83	0,0010	0,0009	0,0008	$2,2 \times 10^{-10}$	0,0003	0,0002	0,0002	$5,2 \times 10^{-9}$
m04	0,0006	0,0004	0,0003	$6,8 \times 10^{-6}$	0,0006	0,0005	0,0005	$7,1 \times 10^{-9}$
M45	0,0002	0,0001	0,0001	$8,5 \times 10^{-8}$	0,0003	0,0003	0,0003	$7,8 \times 10^{-11}$
M84	0,0001	0,0001	0,0001	$9,7 \times 10^{-8}$	0,0002	0,0001	0,0001	$1,4 \times 10^{-8}$

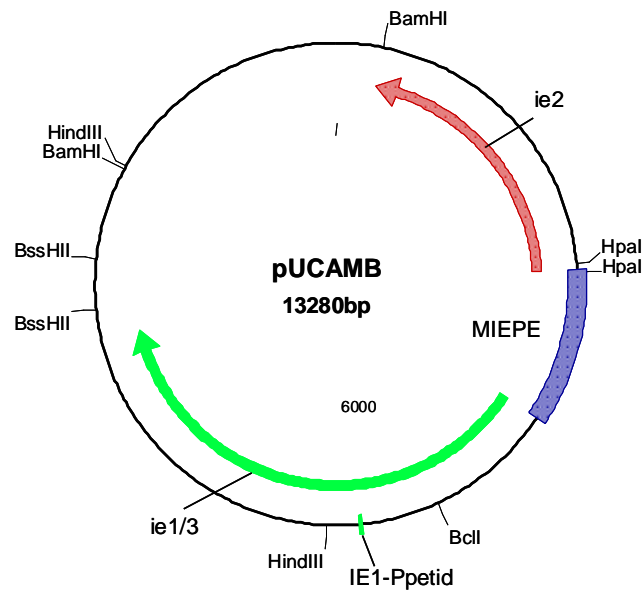
Tab. 6.4 T-Zell Frequenzen von Memory Milzzellen aus mCMV-BAC-WT, Doppelmutante, mCMV-IE1-L176A bzw. mCMV-m164-l265A infizierten BALB/c. n. b.: nicht berechnet.

6.3 Plasmidkarten

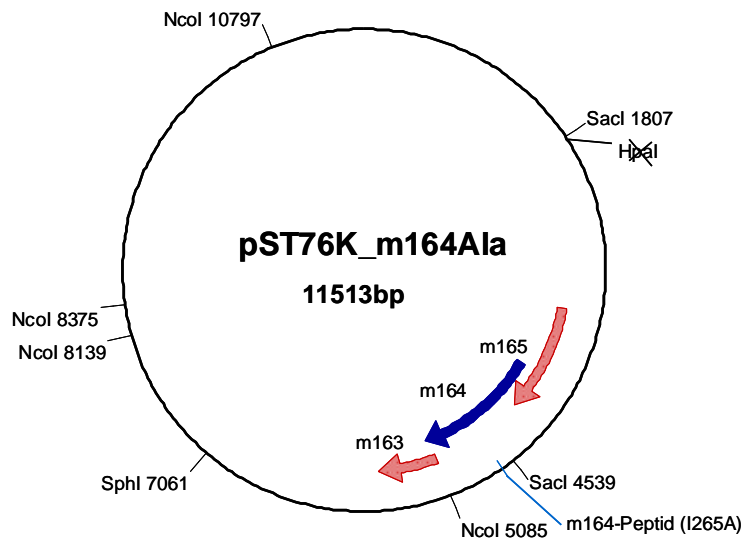
6.3.1 IE1-Shuttle-Plasmide und Zwischenkonstrukte

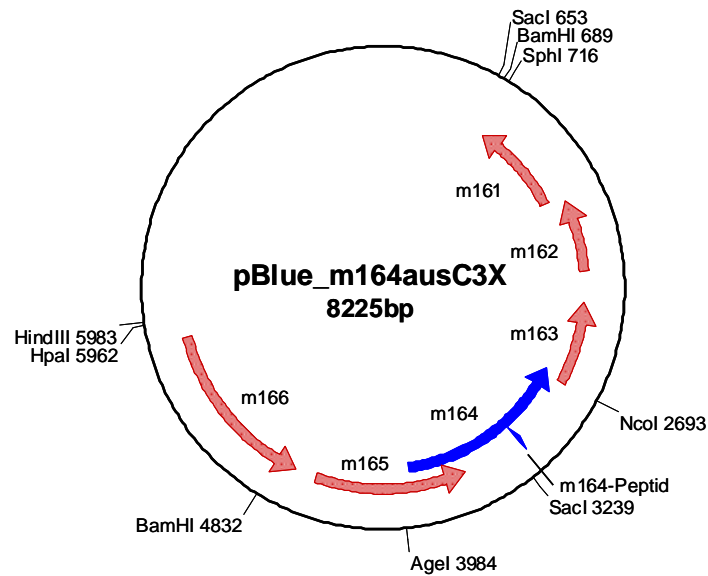
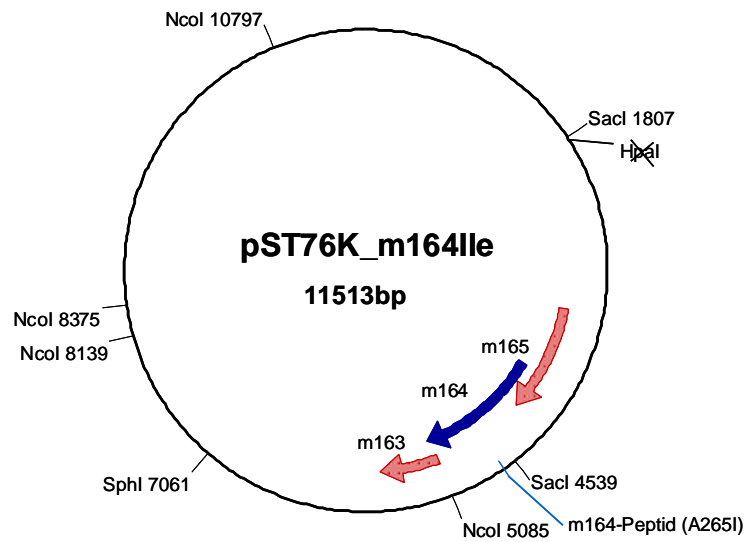






6.3.2 m164-Shuttle-Plasmide und Zwischenkonstrukte





6.4 Alignments

m161 smith	221.149n	atggggctttcctatcacctcacgatgatacacatcatcgcctttatgct
m161 aus BAC	221.150n	atggggctttcctatcacctcacgatgatacacatcatcgcctttatgct
m161 smith	221.099n	tttcatgcatacacaatcgagacacgtctgttcccggagcgcgacgatgt
m161 aus BAC	221.100n	tttcatgcatacacaatcgagacacgtctgttcccggagcgcgacgatgt
m161 smith	221.049n	ccttaagatgtatagaacagtctccgctcggggctcggagcctggggtttcc
m161 aus BAC	221.050n	ccttaagatgtatagaacagtctccgctcggggctcggagcctggggtttcc
m161 smith	220.099n	ttaaccgcacgcgcatcatcgcctagttctcaaaacttgagcgatctcgt
m161 aus BAC	220.100n	ttaaccgcacgcgcatcatcgcctagttctcaaaacttgagcgatctcgt

```

m161 smith      220.949n agtcgcctgccattgtccttttggcaatcgccctagatcataccatctctt
m161 aus BAC    220.950n agtcgcctgccattgtccttttggcaatcgccctagatcataccatctctt

m161 smith      220.899n ggtatgtggactctgaacacgtagctactgtcgacggcgcaccggacggc
m161 aus BAC    220.900n ggtatgtggactctgaacacgtagctactgtcgacggcgcaccggacggc

m161 smith      220.849n atagtgcagatacgggtggagatcagcggcacgtggcgaaacacgtctcg
m161 aus BAC    220.850n atagtgcagatacgggtggagatcagcggcacgtggcgaaacacgtctcg

m161 smith      220.799n ttggcgaggagaccggctctacttttctcgcggtttacggatatcgggac
m161 aus BAC    220.800n ttggcgaggagaccggctctacttttctcgcggtttacggatatcgggac

m161 smith      220.749n gccgcacgcactgtacgtgtagatcgcttcacaagatcgccgtctctccc
m161 aus BAC    220.750n gccgcacgcactgtacgtgtagatcgcttcacaagatcgccgtctctccc

m161 smith      220.699n gagatccgtttcgacgatcccgtctttgacgtttacgtgccagctgatcc
m161 aus BAC    220.700n gagatccgtttcgacgatcccgtctttgacgtttacgtgccagctgatcc

m161 smith      220.649n cagagattggaaaatctcgtcgaccgtgggttcttttgtcatcagcttat
m161 aus BAC    220.650n cagagattggaaaatctcgtcgaccgtgggttcttttgtcatcagcttat

m161 smith      220.599n atttttttt-catatatctatctgcttggaaactcttgcttcggccccgat
m161 aus BAC    220.600n atttttttt-catatatctatctgcttggaaactcttgcttcggccccgat

m161 smith      220.550n aacatcaaacgacgatcgcttcgaccatgcgtctcataa-cgaagctctgt
m161 aus BAC    220.550n aacatcaaacgacgatcgcttcgaccatgcgtctcataa-----

m161 smith      220.500n ttgcttctaggatacctgatacaaatata
m161 aus BAC    -----

```

(Methode: Multiple Alignment FastScan, Max Qual, mit Clone Manager 7, Version 7.04 sowie Align Plus 5, Version 5.04, Sci Ed Central USA)

```

m161 smith      678aa mglsyhltmihiiiafmlfmhtqsrhvcrsrddmslrcieqspgsepffs
m161 aus BAC    639aa mglsyhltmihiiiafmlfmhtqsrhvcrsrddmslrcieqspgsepffs

m161 smith      528aa ltarviiassqnlsvdvlvachpcfngnrlldhtiswyvdsehvatvdgrpdg
m161 aus BAC    489aa ltarviiassqnlsvdvlvachpcfngnrlldhtiswyvdsehvatvdgrpdg

m161 smith      378aa ivqdtveisgtwrntsrwrgdrlyfsrglrisgrthctcrslhkiavsp
m161 aus BAC    339aa ivqdtveisgtwrntsrwrgdrlyfsrglrisgrthctcrslhkiavsp

m161 smith      228aa eirfddpvdvypadprdwkisstvvlvislyfffsyiylglasapi
m161 aus BAC    189aa eirfddpvdvypadprdwkisstvvlvislyff--fiylsawnsfcg

m161 smith      78aa tsnddrfdhashnealfasripdtn STOP
m161 aus BAC    45aa pdnikr-----rslrpcvs STOP

```

(Methode: Compare two sequences, Scoring matrix: Linear, mit Clone Manager 7, Version 7.04 sowie Align Plus 5, Version 5.04, Sci Ed Central USA)

```

mCMV Smith      222351 ggagaagagtcagaatca-tgacgaacgtccgacgcgcgacgaagcgttcg
m164 BAC         1 -----tgacgaacgtccgacgcgcgacgaagcgttcg

mCMV Smith      222401 ttgcgccctccatggctgatggttgcgcgacacgacccattcaccggc
m164 BAC         33 ttgcgccctccatggctgatggttgcgcgacacgacccattcaccggc

mCMV Smith      222451 acgccaccagtaaaataccgatttcgaacgtcgggaacagcgacggcct
m164 BAC         83 acgccaccagtaaaataccgatttcgaacgtcgggaacagcgacggcct

```

mCMV m164	Smith BAC	222501 133	gacgtccgagaccaggtagatgtacacgacgatcgtgacgatggtaatac gacgtccgagaccaggtagatgtacacgacgatcgtgacgatggtaatac
mCMV m164	Smith BAC	222551 183	acagcatcaccacgaaggcggcgaggaaacgctccaactgacagtcgcag acagcatcaccacgaaggcggcgaggaaacgctccaactgacagtcgcag
mCMV m164	Smith BAC	222601 233	ctcttcgatccggttgaactgcgcgccacgtggacgggtcgacattcgat ctcttcgatccggttgaactgcgcgccacgtggacgggtcgacattcgat
mCMV m164	Smith BAC	222651 283	cgtcggcaaggatagcaggttaccgcccggacccgacgacgcacgatacgc cgtcggcaaggatagtaggttaccgcccggacccgacgacgcacgatacgc
mCMV m164	Smith BAC	222701 333	agacggggaggtcggagcggatcggaaaactgagggccaggtcggatgcg agacggggaggtcggagcggatcggaaaactgagggccaggtcggatgcg
mCMV m164	Smith BAC	222751 383	ttgacggtaaaaccctcgagccggttcgacatccacaagaagtcggtggt ttgacggtaaaaccctcgagccggttcgacatccacaagaagtcggtggt
mCMV m164	Smith BAC	222801 433	gcccgaaggtctcctcgcccgtgccacgatggcctggttgttgacggccc gcccgaaggtctcctcgcccgtgccacgatggcctggttgttgacggccc
mCMV m164	Smith BAC	222851 483	agaagatgcgcgagtaccgaggaggcccgcgctcagcgcgccacgctccga agaagatgcgcgagtaccgaggaggcccgcgctcagcgcgccacgctccga
mCMV m164	Smith BAC	222901 533	cagtagtcctttccgaacggctccgcccgcgctccggtaccaccggctcgat cagtagtcctttccgaacggctccgcccgcgctccggtaccaccggctcgat
mCMV m164	Smith BAC	222951 583	cgtcaggagctcctcgcccgggacccaacgtaggaggggaggcggaatca cgtcaggagctcctcgcccgggacccaacgtaggaggggaggcggaatca
mCMV m164	Smith BAC	223001 633	gacacatagcctggctcacatggctgatgtcgcacacgacgaggcccag gacacatagcctggctcacatggctgatgtcgcacacgacgaggcccag
mCMV m164	Smith BAC	223051 683	aagccgctaggcggccacagctcggctcgtcattgacagcgcgctccgcat aagccgctaggcggccacagctcggctcgtcattgacagcgcgctccgcat
mCMV m164	Smith BAC	223101 733	ccccgtgaaaccggcgacgtggatgtgaaagctctcggcatcgaacgtgg ccccgtgaaaccggcgacgtggatgtgaaagctctcggcatcgaacgtgg
mCMV m164	Smith BAC	223151 783	cgatcgtcgtcgtctggaatcacggccttcgggcagcgcgaacgaccag cgatcgtcgtcgtctggaatcacggccttcgggcagcgcgaacgaccag
mCMV m164	Smith BAC	223201 833	ctcccgacaaaacttcttcaccgaaccgggtttcacgtggcagatcacggc ctcccgacaaaacttcttcaccgaaccgggtttcacgtggcagatcacggc
mCMV m164	Smith BAC	223251 883	ggctttgtcctggctcgggatagatcttgttcatgcagttatctgagagga ggctttgtcctggctcgggatagatcttgttcatgcagttatctgagagga
mCMV m164	Smith BAC	223301 933	ctccgctgacgcagcttccgacggcggacgccgaggccgctgcccgacgt ctccgctgacgcagcttccgacggcggacgccgaggccgctgcccgacgt
mCMV m164	Smith BAC	223351 983	gaagccgcccgcgtagatgagggcgagcatcccggccttgaagagtcgctcg gaagccgcccgcgtagatgagggcgagcatcccggccttgaagagtcgctcg
mCMV m164	Smith BAC	223401 1033	ggatcgacggctcctcctcggctccaggggatacagaacgggagtcgctcggc ggatcgacggctcctcctcggctccaggggatacagaacgggagtcgctcggc
mCMV m164	Smith BAC	223451 1083	ggtagcggcgacgcggtcttctggaagaggtcggtaacacagcaggacca ggtagcggcgacgcggtcttctggaagaggtcggtaacacagcaggacca
mCMV m164	Smith BAC	223501 1133	cgaggaccgacccgagtgccgcccggctaccccgatcgaaatgggtaca cgaggaccgacccgagtgccgcccggctaccccgatcgaaatgggtaca

```

mCMV Smith 223551 cgcaacgcgctcgctcggcacatcggcaactcgggttccccgcatacctgcc
m164 BAC 1183 cgcaacgcgctcgctcggcacatcggcaactcgggttccccgcatacctgcc

mCMV Smith 223601 gggagacggtagctgcgcgtctccccctccgacagccgaggagaaacat
m164 BAC 1233 gggagacggtagctgcgcgtctccccctccgacagccgaggagaaacat

```

(Methode: Multiple Alignment FastScan, Max Qual, mit Clone Manager 7, Version 7.04 sowie Align Plus 5, Version 5.04, Sci Ed Central USA)

6.5 Sequenzierung der HA-Epitop-Sequenz Insertion

Sequenzierung von mCMV-BAC-m164-3'HAtag:

```

1  gggtaggaag gcgttccccg tacactgctt gtcgcgcgat cgacgaggag aagagtcaga atcaaggacg
   cccatgcttc cgcaagggct atgtgacgaa cagcgcgcta gctgctcttc ttctcagtct tagttctctg
                                     m163                                     altes stop <<<
                                                                                   EcoRI
                                                                                   +-----
71  acgacgacaa gtaagaagtt cctattctct agaaagtata ggaacttcga attccccatgt cagccgtaa
   tgctgctggt cattcttcaa ggataagaga tctttcatat ccttgaagct taagggtaga gtcggcaatt
                                     frt
141 gtgttctctg taagcgtagt ctgggacgtc gtatgggtat gacgaacgtc cgacgcgcca cgaagcgttc
   cacaaggacg attegcatca gacctgcag catacccata ctgcttgcag gctgcgcgct gcttcgcaag
   neues Stop <<<                                     m164
                                     <<.....HA.....<<
                                     a y d p v d y p y
211 gttgcggccc tccatggtg atgggttgcgc gacacgaccc cattcaccgg cagcccacca gtaaaatacc
   caacgcgggg aggtaccgac taccacgcgc ctgtgctggg gtaagtggcc gtgcgggtgg cattttatgg

281 ggatttcgaa cgtcgggaac
   cctaaagctt gcagcccttg

```

Sequenzierung von mCMV-BAC-m164-5'HAtag:

```

1  cccgatcgaa atggttacac gaaacgcgtc gtcggcacat cggaactcn mngttccccg cactctgcca
   gggctagctt taccgatgtg cgttgcgcag cagccgtgta gccgttgagn mccaaggggc gtaggacggt

71  gggagacggg agctgcgcgt ctccccctcc gacagccgcg gagaaaagcg tagtctggga cgtcgtatgg
   cctctgcca tcgacgcgca gagggggagg ctgtcgcgcg ctcttttcgc atcagacct gcagcatacc
                                     m164                                     <<.....HA.....<
                                                                                   a y d p v d y p
                                                                                   EcoRI
                                                                                   +----
141 gtacatagga cgacgacgac aagtagaag ttcctattct ctagaagta taggaacttc gaattcccat
   catgtatect gctgctgctg ttcattcttc aaggataaga gatctttcat atcettgaag ctttaagggta
   <<<                                     frt
   y m (neues Start)

211 gtcagccggt aagtgttctt gcategcctt cccacgtgtg tggcgacccg aggccccaag atctggcagg
   cagtccggcaa ttcacaagga cgtagcggaa ggggtgcacac accgctgggc tccgggggttc tagaccgtcc
   (altes Start) <<<
                                     m
                                     .....m165.....<<

281 agaagcac
   tcttcgtg

```

6.6 LightCycler PCR-Profil

Initialer Aktivierungsschritt	15min	95°C	Ramp 20°C/s	Aktivierung der HotStar Taq-DNA-Polymerase
<i>3-Schritt Cycling</i>				
Denaturierung	15s	94°C	Ramp 20°C/s	
Annealing	30s	62°C	Ramp 20°C/s	
Extension	15s	72°C	Ramp 20°C/s	Daten Akquisition „single mode“
Zyklenzahl	50			
Schmelzkurve				
Denaturierung	15s	98°C	Ramp 20°C/s	
Annealing	15s	65°C	Ramp 20°C/s	
		65-94°C	Ramp 0,1°C/s	kontinuierliche Daten Akquisition
Ende	∞	40°C		

6.7 TaqMan-Analyse zur Berechnung der Genom-zu-PFU-Verhältnisse

	Titer [PFU/ml]	V-Faktor	getestete PFU	Qty			Genome/PFU (Qty/getestete PFU)			Mittelwert			Mittelwert-gesamt	
				I	II	III	I	II	III	I	II	III		
WT-mCMV	1.40E+09	1.00E+05	1.40E+04	4.27E+06	5.80E+06	3.84E+06	3.05E+02	4.14E+02	2.74E+02	3.38E+02	3.78E+02	2.71E+02	3.29E+02	
		1.00E+06	1.40E+03	4.86E+05	5.21E+05	4.21E+05	3.47E+02	3.72E+02	3.01E+02					
		1.00E+07	1.40E+02	4.37E+04	5.62E+04	3.88E+04	3.12E+02	3.79E+02	2.27E+02					
		1.00E+08	1.40E+01	4.32E+03	5.30E+03	3.18E+03	3.08E+02	3.74E+02	2.27E+02					
		1.00E+09	1.40E+00	5.18E+02	5.24E+02	4.86E+02	3.70E+02	3.87E+02	2.02E+02					
		1.00E+09	1.40E+00	5.42E+02	4.60E+02	2.83E+02	3.87E+02	3.29E+02	2.02E+02					
		3.50E+08	5.00E+04	7.00E+03	4.30E+06	5.25E+06	3.38E+06	6.14E+02	7.50E+02	4.93E+02	5.79E+02	7.88E+02	4.81E+02	6.16E+02
		5.00E+05	4.11E+05	4.11E+05	5.45E+05	3.49E+05	5.87E+02	5.87E+02	7.79E+02	4.89E+02				
		5.00E+06	7.00E+01	4.48E+04	5.14E+04	3.44E+04	6.40E+02	6.40E+02	7.34E+02	4.91E+02				
mCMV-BAC-WT		5.00E+07	7.00E+00	3.80E+03	6.00E+03	2.61E+03	5.43E+02	8.57E+02	3.73E+02					
		5.00E+08	7.00E-01	3.88E+02	5.06E+02	3.33E+02	5.54E+02	7.23E+02	4.76E+02					
		5.00E+08	7.00E-01	3.76E+02	6.18E+02	3.94E+02	5.37E+02	8.83E+02	5.63E+02					
		2.30E+08	1.33E+04	1.73E+04	8.55E+06	7.58E+06	1.24E+07	4.94E+02	4.38E+02	4.43E+02	4.68E+02	5.53E+02	4.88E+02	
		1.33E+05	1.73E+03	7.29E+03	7.57E+05	1.12E+06	4.21E+06	4.21E+02	4.38E+02	6.47E+02				
		1.33E+06	1.73E+02	1.00E+05	1.18E+05	9.45E+04	5.81E+02	5.81E+02	6.83E+02	5.46E+02				
		1.33E+07	1.73E+01	7.92E+03	8.46E+03	8.28E+03	4.58E+02	4.89E+02	4.78E+02					
		1.33E+08	1.73E+00	5.48E+02	7.25E+02	7.14E+02	3.17E+02	4.19E+02	4.13E+02					
		1.33E+08	1.70E+00	6.57E+02	5.75E+02	8.76E+02	3.88E+02	3.88E+02	5.15E+02					
mCMV-IE1-A176L	2.10E+08	1.33E+04	1.58E+04	6.30E+06	6.69E+06	6.67E+06	3.99E+02	4.23E+02	4.22E+02	4.58E+02	3.70E+02	4.19E+02	4.16E+02	
		1.33E+05	1.58E+03	7.56E+05	6.75E+05	7.95E+05	4.78E+02	4.27E+02	5.03E+02					
		1.33E+06	1.58E+02	5.56E+04	5.56E+04	7.46E+04	3.52E+02	3.52E+02	4.72E+02					
		1.33E+07	1.58E+01	8.03E+03	5.71E+03	5.63E+03	5.08E+02	3.62E+02	3.56E+02					
		1.33E+08	1.58E+00	8.77E+02	5.28E+02	5.70E+02	5.55E+02	3.34E+02	3.61E+02					
		1.33E+08	1.58E+00	5.06E+02	5.06E+02	6.35E+02	3.20E+02	3.20E+02	4.02E+02					
		6.50E+08	6.66E+04	9.80E+03	7.92E+06	1.17E+07	1.49E+07	8.08E+02	1.19E+03	1.52E+03	8.69E+02	1.29E+03	1.25E+03	1.14E+03
		6.66E+05	9.80E+02	9.80E+02	8.01E+05	1.12E+06	1.64E+06	8.17E+02	1.14E+03	1.67E+03				
		6.66E+06	9.80E+01	7.70E+04	7.70E+04	1.42E+05	1.21E+05	7.85E+02	1.45E+03	1.23E+03				
mCMV-IE1-A176F		6.66E+07	9.80E+00	8.91E+03	1.39E+04	1.10E+04	9.09E+02	1.42E+03	1.43E+03					
		6.66E+08	9.80E-01	9.24E+02	1.28E+03	9.33E+02	9.43E+02	1.30E+03	9.52E+02					
		6.66E+08	9.80E-01	9.32E+02	1.23E+03	9.90E+02	9.51E+02	1.26E+03	1.01E+03					
		3.60E+08	1.33E+04	2.70E+04	1.42E+07	3.03E+07	2.04E+07	5.28E+02	1.12E+03	8.67E+02	1.07E+03	1.26E+03	1.07E+03	
		1.33E+05	2.70E+03	2.36E+06	3.91E+06	2.81E+06	8.74E+02	8.74E+02	1.45E+03	1.04E+03				
		1.33E+06	2.70E+02	2.18E+05	2.97E+05	3.19E+05	8.06E+02	8.06E+02	1.10E+03	1.18E+03				
		1.33E+07	2.70E+01	2.40E+04	2.25E+04	4.42E+04	8.90E+02	8.90E+02	1.64E+03					
		1.33E+08	2.70E+00	2.30E+03	2.35E+03	3.89E+03	8.51E+02	8.51E+02	1.44E+03					
		1.33E+08	2.70E+00	3.38E+03	2.82E+03	4.05E+03	1.25E+03	1.25E+03	1.04E+03					

Tab. 6.5 Berechnete Genom-zu-PFU Verhältnisse der aufgeführten mCMV. V-Faktor (Verdünnungsfaktor), Qty (Quantity).

	Titer [PFU/ml]	V-Faktor	getestete PFU	Qty			Genome/PFU (Qty/getestete PFU)			Mittelwert			Mittelwert-gesamt	
				I	II	III	I	II	III	I	II	III		
mCMV-m164-1265A	8,00E+07	5,00E+03	1,60E+04	3,34E+06	3,66E+06	4,79E+06	2,09E+02	2,29E+02	2,99E+02	1,79E+02	1,64E+02	2,46E+02	1,96E+02	
		5,00E+04	1,60E+03	3,74E+05	2,95E+05	4,48E+05	2,34E+02	1,84E+02	2,80E+02					
		5,00E+05	1,60E+02	9,00E+03	2,37E+04	3,93E+04	5,62E+01	1,48E+02	2,46E+02					
		5,00E+06	1,60E+01	2,91E+03	2,34E+03	3,11E+03	1,82E+02	1,46E+02	1,95E+02					
		5,00E+07	1,60E+00	2,10E+02	2,29E+02	3,64E+02	1,32E+02	1,43E+02	2,28E+02					
		5,00E+07	1,60E+00	4,16E+02	2,13E+02	3,68E+02	2,60E+02	1,33E+02	2,30E+02					
		2,20E+08	1,00E+04	2,20E+04	2,40E+06	2,70E+06	1,74E+06	1,09E+02	1,23E+02	7,91E+01	8,92E+01	7,24E+01	7,12E+01	7,76E+01
Doppelmutante		1,00E+05	2,20E+03	2,61E+05	1,80E+05	1,75E+05	1,19E+02	8,20E+01	7,96E+01					
		1,00E+06	2,20E+02	2,12E+04	1,16E+04	1,20E+04	9,66E+01	5,27E+01	5,48E+01					
		1,00E+07	2,20E+01	1,62E+03	1,36E+03	1,43E+03	7,37E+01	6,16E+01	6,51E+01					
		1,00E+08	2,20E+00	1,07E+02	1,09E+02	1,09E+02	4,86E+01	4,95E+01	4,95E+01					
		1,00E+08	2,20E+00	1,95E+02	1,45E+02	2,18E+02	8,86E+01	6,59E+01	9,91E+01					
		4,40E+07	5,00E+03	8,80E+03	8,68E+06	5,96E+06	3,21E+06	9,86E+02	6,77E+02	3,65E+02	8,20E+02	5,39E+02	3,54E+02	5,71E+02
			5,00E+04	8,80E+02	7,01E+05	4,82E+05	4,75E+05	7,96E+02	5,47E+02	5,40E+02				
Doppelrevertante		5,00E+05	8,80E+01	8,71E+04	5,02E+04	4,11E+04	9,90E+02	5,70E+02	4,67E+02					
		5,00E+06	8,80E+00	7,62E+03	4,50E+03	3,15E+03	8,66E+02	5,12E+02	3,58E+02					
		5,00E+07	8,80E-01	6,82E+02	4,02E+02	2,51E+02	7,75E+02	4,57E+02	2,85E+02					
		5,00E+07	8,80E-01	4,46E+02	4,16E+02	9,80E+01	5,07E+02	4,73E+02	1,11E+02					
		6,20E+07	5,17E+03	1,20E+04	3,35E+06	4,44E+06	4,34E+06	2,79E+02	3,70E+02	3,62E+02	2,24E+02	3,08E+02	3,45E+02	2,92E+02
		5,17E+04	1,20E+03	3,64E+05	4,40E+05	3,84E+05	3,03E+02	3,66E+02	3,20E+02					
		5,17E+05	1,20E+02	2,45E+04	4,12E+04	4,12E+04	2,04E+02	3,43E+02	3,43E+02					
	5,17E+06	1,20E+01	2,72E+03	2,30E+03	3,10E+03	2,27E+02	1,91E+02	2,58E+02						
	5,17E+07	1,20E+00	2,27E+02	3,60E+02	3,60E+02	6,94E+02	1,89E+02	3,00E+02	5,78E+02					
	5,17E+07	1,20E+00	1,72E+00	3,29E+02	3,29E+02	2,52E+02	1,43E+02	2,74E+02	2,10E+02					

Tab. 6.6 Berechnete Genom-zu-PFU Verhältnisse der aufgeführten mCMV. V-Faktor (Verdünnungsfaktor), Qty (Quantity).

6.8 Quantifizierung der *in vivo*-Replikation mittels qPCR

6.8.1 Original *TaqMan* Daten

In den nachfolgenden Tabellen sind die originalen *TaqMan* Daten und die daraus resultierenden viralen Genome pro 10^6 Zellen (Z), die zur Bestimmung der *in vivo*-Replikation (siehe 3.8.1) dienen, aufgeführt.

mCMV-BAC-WT:

Tag p.i.	Maus Nr.	Pfote			Milz		
		gB	pthrp	Genome/ 10^6 Z	gB	pthrp	Genome/ 10^6 Z
1A	1	1,3e+03	1,1e+04	2,00E+05	1,5e+02	2,5e+04	1,00E+04
	2	1,9e+03	1,1e+04	3,00E+05	0	3,8e+04	
	3	1,5e+03	8,9e+03	3,00E+05	1,3e+00	2,2e+04	1,00E+02
2B	1	3,6e+04	6,4e+03	1,13E+07	1,3e+03	1,5e+04	1,70E+05
	2	6,0e+04	6,0e+03	2,00E+07	4,9e+00	1,3e+04	8,00E+02
	3	1,7e+05	5,2e+03	6,54E+07	2,4e+01	1,4e+04	3,00E+02
4C	1	2,5e+05	7,9e+03	6,33E+07	4,4e+02	1,2e+04	7,00E+04
	2	3,4e+05	9,1e+03	7,47E+07	5,0e+02	1,5e+04	7,00E+04
	3	3,6e+05	1,2e+04	6,00E+07	5,8e+02	1,6e+04	7,00E+04
6D	1	1,2e+06	8,1e+03	2,96E+08	2,2e+04	3,4e+04	1,30E+06
	2	7,7e+05	1,2e+04	1,28E+08	2,4e+03	4,2e+04	1,00E+05
	3	2,7e+06	1,5e+04	3,60E+08	3,6e+05	2,0e+04	3,60E+07
8E	1	1,6e+06	1,3e+04	2,46E+08	6,0e+04	2,2e+04	5,50E+06
	2	3,6e+06	1,8e+04	4,00E+08	3,1e+04	2,3e+04	2,70E+06
	3	3,3e+06	2,3e+04	2,87E+08	5,9e+04	3,2e+04	3,70E+06
10F	1	3,3e+06	1,2e+04	5,50E+08	7,9e+06	4,7e+04	3,36E+08
	2	3,9e+06	1,0e+04	7,80E+08	3,7e+06	3,7e+04	2,00E+08
	3	4,9e+06	1,0e+04	9,80E+08	4,0e+06	3,5e+04	2,29E+08

mCMV-IE1-L176A (Funktionsverlust-Mutante):

Tag p.i.	Maus Nr.	Pfote			Milz		
		gB	pthrp	Genome/ 10^6 Z	gB	pthrp	Genome/ 10^6 Z
1A	1	2,5e+02	8,7e+03	6,00E+04	6,1e+00	2,9e+04	4,00E+02
	2	5,8e+02	1,1e+04	1,00E+05	3,4e+00	2,9e+04	2,00E+02
	3	5,7e+02	1,2e+04	1,00E+05	5,9e+00	3,5e+04	3,00E+02
2B	1	7,8e+04	8,5e+03	1,84E+07	2,5e+01	3,1e+04	2,00E+03
	2	6,1e+04	1,0e+04	1,22E+07	1,0e+01	2,6e+04	8,00E+02
	3	3,3e+04	1,0e+04	6,60E+06	1,0e+01	2,9e+04	7,00E+02
4C	1	2,8e+05	1,2e+04	4,67E+07	7,7e+02	5,3e+04	3,00E+04
	2	3,2e+05	7,0e+03	9,14E+07	2,0e+02	2,0e+04	2,00E+04
	3	2,9e+05	6,6e+03	8,78E+07	0	0	0

6D	1	5,6e+05	2,8e+04	4,00E+07	1,2e+04	3,6e+04	7,00E+05
	2	6,3e+05	5,5e+04	2,29E+07	1,4e+03	3,9e+04	7,00E+04
	3	6,0e+05	2,3e+04	5,22E+07	1,2e+04	3,4e+04	7,00E+04
8E	1	2,4e+06	9,1e+03	5,28E+08	4,2e+04	2,4e+04	3,50E+06
	2	6,7e+05	7,7e+03	1,74E+08	1,3e+04	3,8e+04	7,00E+05
	3	2,4e+06	1,1e+04	4,36E+08	9,3e+04	2,9e+04	6,40E+06
10F	1	4,3e+06	1,1e+04	7,82E+08	4,8e+06	4,2e+04	2,29E+08
	2	4,1e+06	1,6e+04	5,13E+08	3,2e+06	2,2e+04	2,91E+08
	3	4,5e+06	1,7e+04	5,29E+08	0	0	0

mCMV-IE1-A176L (authentische Revertante):

Tag p.i.	Maus Nr.	Pfote			Milz		
		gB	pthrp	Genome/10 ⁶ Z	gB	pthrp	Genome/10 ⁶ Z
1	1	3,6e+04	8,0e+04	9,00E+05	5,9e+03	2,0e+05	6,00E+04
	2	1,2e+04	7,3e+04	3,00E+05	1,9e+03	1,9e+05	2,00E+04
	3	1,7e+04	8,0e+04	4,00E+05	1,2e+03	2,1e+05	1,00E+04
2	1	2,9e+05	6,2e+04	9,40E+06	1,6e+04	2,1e+05	2,00E+05
	2	2,2e+05	5,7e+04	7,70E+06	1,3e+04	2,1e+05	1,00E+05
	3	5,0e+05	7,7e+04	1,30E+07	2,4e+04	1,1e+05	4,00E+05
4	1	1,5e+06	5,5e+04	5,45E+07	1,2e+04	9,7e+04	3,00E+05
	2	1,2e+06	4,8e+04	5,00E+07	1,8e+03	1,9e+05	2,00E+04
	3	1,1e+06	6,3e+04	3,50E+07	2,2e+02	2,0e+05	2,00E+03
6	1	5,8e+06	3,8e+04	3,05E+08	6,2e+04	2,3e+05	5,00E+05
	2	8,8e+06	4,8e+04	3,67E+08	8,3e+03	1,9e+05	9,00E+04
	3	3,8e+06	4,1e+04	1,73E+08	9,1e+03	2,1e+05	9,00E+04
8	1	1,3e+07	4,1e+04	6,34E+08	3,9e+05	1,5e+05	5,20E+06
	2	1,4e+07	4,6e+04	6,09E+08	2,0e+05	1,1e+05	3,60E+06
	3	1,2e+07	4,8e+04	5,00E+08	3,3e+05	1,5e+05	4,40E+06
10	1	1,5e+07	4,2e+04	7,14E+08	1,7e+07	1,2e+05	2,83E+08
	2	2,0e+07	4,7e+04	8,51E+08	1,5e+07	1,6e+05	1,88E+08
	3	1,3e+07	4,7e+04	5,53E+08	2,1e+06	1,2e+05	3,50E+07

mCMV-IE1-A176L* (Wobble-Revertante):

Tag p.i.	Maus Nr.	Pfote			Milz		
		gB	pthrp	Genome/10 ⁶ Z	gB	pthrp	Genome/10 ⁶ Z
1A	1	1,1e+03	7,9e+03	3,00E+05	0	2,9e+04	0
	2	1,1e+03	9,1e+03	2,00E+05	2,6e+00	2,3e+04	2,00E+02
	3	5,5e+02	5,2e+03	2,00E+05	2,8e+00	3,7e+04	2,00E+02
2B	1	1,3e+04	7,5e+03	3,50E+06	1,1e+00	3,7e+04	6,00E+01
	2	6,9e+03	7,6e+03	1,80E+06	6,1e+01	3,3e+04	4,00E+03
	3	9,3e+03	6,1e+03	3,10E+06	3,1e+00	3,9e+04	2,00E+02
4C	1	1,0e+05	4,3e+03	4,65E+07	1,0e+03	3,6e+04	6,00E+04
	2	2,8e+05	6,5e+03	8,62E+07	8,1e+03	3,8e+04	4,30E+05
	3	3,2e+05	6,9e+03	9,28E+07	2,8e+03	3,2e+04	1,80E+05

6D	1	9,2e+05	6,7e+03	2,75E+08	4,1e+03	4,2e+04	2,00E+05
	2	5,2e+05	6,0e+03	1,73E+08	1,4e+02	3,4e+04	8,00E+03
	3	1,2e+06	8,6e+03	2,79E+08	1,4e+03	3,5e+04	8,00E+04
8E	1	1,9e+06	8,2e+03	4,63E+08	6,9e+04	2,8e+04	4,90E+06
	2	2,3e+06	1,0e+04	4,60E+08	5,8e+04	3,2e+04	3,60E+06
	3	1,1e+06	1,2e+04	1,83E+08	5,3e+04	1,9e+04	5,60E+06
10F	1	4,5e+06	7,1e+03	1,27E+09	2,1e+06	2,6e+04	1,62E+08
	2	3,3e+06	8,2e+03	8,05E+08	3,0e+06	2,6e+04	2,31E+08
	3	5,3e+06	9,9e+03	1,07E+09	2,3e+06	2,8e+04	1,64E+08

mCMV-IE1-A176F (funktionelles IE1 Analogon):

Tag p.i.	Maus Nr.	Pfote			Milz		
		gB	pthrp	Genome/10 ⁶ Z	gB	pthrp	Genome/10 ⁶ Z
1A	1	3,1e+02	3,9e+03	2,00E+05	4,3e+01	5,8e+04	2,00E+03
	2	5,8e+02	1,1e+04	1,00E+05	8,7e+00	4,2e+04	4,00E+02
	3	1,2e+03	1,1e+04	2,00E+05	1,6e+01	4,1e+04	8,00E+02
2B	1	9,1e+03	8,8e+03	2,10E+06	1,0e+01	4,1e+04	5,00E+02
	2	2,7e+04	8,1e+03	6,70E+06	2,9e+01	3,6e+04	2,00E+03
	3	4,7e+03	6,9e+03	1,40E+06	1,7e+03	4,8e+04	7,00E+04
4C	1	4,0e+05	1,2e+04	6,67E+07	4,5e+03	4,3e+04	2,00E+05
	2	2,0e+05	8,7e+03	4,60E+07	1,7e+03	1,8e+04	2,00E+05
	3	2,5e+05	1,1e+04	4,55E+07	1,2e+02	3,2e+04	1,00E+04
6D	1	3,1e+05	5,2e+03	1,19E+08	7,5e+03	5,9e+04	3,00E+05
	2	6,1e+05	1,0e+04	1,22E+08	3,7e+03	7,7e+04	1,00E+05
	3	5,8e+05	1,9e+04	6,11E+07	6,5e+03	3,3e+04	4,00E+05
8E	1	3,8e+06	1,4e+04	5,43E+08	3,2e+05	2,6e+04	2,46E+07
	2	3,6e+06	1,4e+04	5,14E+08	7,5e+04	3,0e+04	5,00E+06
	3	1,9e+06	1,4e+04	2,71E+08	5,8e+04	2,5e+04	4,60E+06
10F	1	9,3e+06	1,4e+04	1,33E+09	9,1e+06	2,4e+04	7,58E+08
	2	3,9e+06	1,2e+04	6,50E+08	1,1e+07	2,7e+04	8,15E+08
	3	6,4e+06	1,2e+04	1,07E+09	1,3e+07	2,6e+04	1,00E+09

6.8.2 Verdopplungszeiten der mCMV-IE1-Mutanten im Vergleich zu mCMV-BAC-WT

	Pfote		Milz		Virus
	Steigung m	T _{Doppel} [h]	Steigung m	T _{Doppel} [h]	
<i>upper</i>	0,416	17,4	0,663	10,9	mCMV-IE1-L176A (I)
<i>MPN</i>	0,343	21,1	0,615	11,7	
<i>lower</i>	0,269	26,9	0,563	12,8	
<i>upper</i>	0,375	19,3	0,689	10,5	mCMV-IE1-A176L (II)
<i>MPN</i>	0,326	22,2	0,631	11,4	
<i>lower</i>	0,278	26,0	0,564	12,8	
<i>upper</i>	0,429	16,8	0,720	10,0	mCMV-IE1-A176L* (III)
<i>MPN</i>	0,376	19,2	0,641	11,3	
<i>lower</i>	0,321	22,5	0,560	12,9	
<i>upper</i>	0,438	16,5	0,689	10,5	mCMV-IE1-A176F (IV)
<i>MPN</i>	0,386	18,7	0,623	11,6	
<i>lower</i>	0,335	21,6	0,556	13,0	
<i>upper</i>	0,375	19,3	0,665	10,9	mCMV-BAC-WT (V)
<i>MPN</i>	0,309	23,4	0,575	12,6	
<i>lower</i>	0,243	29,7	0,487	14,8	

Tab. 6.7 Vergleich der *in vivo*-Verdopplungszeiten von mCMV-IE1-Mutanten mit mCMV-BAC-WT in Pfote und Milz. Durch lineare Regressions-Analyse unter Verwendung von Mathematica V5.0 Statistik-Software ("*Linear Regression*"; Wolfram Research Inc.) konnten die *Most Probable Numbers* (MPNs) der Steigung m (Regressionsgeraden in Abb. 3.25 dargestellt), sowie das 95% Konfidenzintervall (*upper*, *lower*) der Steigung bestimmt werden. Die Berechnung der Verdopplungszeit (T_{Doppel}) erfolgte direkt aus der Steigung m nach folgender Formel: $T_{Doppel} = (\log_{10}(2) / m) \times 24h$. Für alle Berechnungen waren die P-Werte der zufälligen, nichtlinearen Verteilung <0,001.

	Leber				Virus
	Steigung m	Absolutes-Glied b	Z [d]	T _{Doppel} [h]	
<i>upper</i>	0,54	-2,42	3,3-5,4	18,8	mCMV-IE1-L176A (I)
<i>MPN</i>	0,49	-2,1		22,0	
<i>lower</i>	0,45	-1,78		26,2	
<i>upper</i>	0,52	-2,4	3,5-5,3	19,8	mCMV-IE1-A176L (II)
<i>MPN</i>	0,48	-2,1		23,0	
<i>lower</i>	0,45	-1,85		27,5	
<i>upper</i>	0,46	-1,7	1,1-5,8	19,1	mCMV-IE1-A176L* (III)
<i>MPN</i>	0,38	-1,1		23,0	
<i>lower</i>	0,29	-0,48		28,9	
<i>upper</i>	0,46	-1,5	0,9-4,7	18,2	mCMV-IE1-A176F (IV)
<i>MPN</i>	0,39	-0,94		21,2	
<i>lower</i>	0,32	-0,41		25,3	
<i>upper</i>	0,51	-1,88	2,4-4,6	18,5	mCMV-BAC-WT (V)
<i>MPN</i>	0,46	-1,5		21,0	
<i>lower</i>	0,41	-1,19		24,4	

Tab. 6.8 Vergleich der *in vivo*-Verdopplungszeiten von mCMV-IE1-Mutanten mit mCMV-BAC-WT in der Leber. Die Berechnung von T_{Doppel} in der Leber erfolgte analog zu Pfote und Milz (siehe Tabelle 6.7). Berechnung des Zeitintervalls Z: $Z_{lower} < Z < Z_{upper}$ $Z_{lower} = -b_{lower} / m_{upper}$, $Z_{upper} = -b_{upper} / m_{lower}$

7 Veröffentlichungen

Veröffentlichungen:

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. 2005. Murine model of cytomegalovirus latency and reactivation: the silencing/desilencing and immune sensing hypothesis. Chapter 23 *In Cytomegaloviruses: Molecular Biology and Immunology* (M. J. Reddehase, ed.). Caister Academic Press, Hethersett, Norwich, U. K.; im Druck.

Reddehase, M. J., C. O. Simon, J. Podlech, and R. Holtappels. 2004. Stalemating a clever opportunist: lessons from murine cytomegalovirus. *Hum. Immunol.* 65: 446-455.

Holtappels, R., J. Podlech, M.-F. Pahl-Seibert, M. Jülch, D. Thomas, C. O. Simon, M. Wagner, and M. J. Reddehase. 2004. Cytomegalovirus misleads its host by priming of CD8 T cells specific for an epitope not presented in infected tissues. *J. Exp. Med.* 199: 131-136.

Holtappels, R., N. K. A. Grzimek, C. O. Simon, D. Thomas, D. Dreis, and M. J. Reddehase. 2002. Processing and presentation of murine cytomegalovirus pORFm164-derived peptide in fibroblasts in the face of all viral immunosubversive early gene functions. *J. Virol.* 76: 6044-6053.

Vorträge:

Simon, C. O., D. Dreis, and N. K.A. Grzimek-Koschewa. 2003. Role of TNF-alpha in murine cytomegalovirus latency and reactivation in the lungs. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Berlin, 26.–29.03.

Poster:

Oehrlein-Karpi, S. A., T. Däubner, C. O. Simon, A. Renzaho, N. K. A. Grzimek-Koschewa, and M. J. Reddehase. 2004. The m164 protein of murine cytomegalovirus. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Tübingen, 17.–20.03

Grzimek-Koschewa, N. K. A., C. O. Simon, C. K. Seckert, D. Dreis, and M. J. Reddehase. 2003. Role of TNF-alpha in murine cytomegalovirus latency and reactivation in the lungs. 9th International Cytomegalovirus Workshop, Maastricht, NL 20.–25.05.

Grzimek-Koschewa, N. K. A., C. O. Simon, C. K. Seckert, D. Dreis, and M. J. Reddehase. 2003. Role of TNF-alpha in murine cytomegalovirus latency and reactivation in the lungs. 28th International Herpesvirus Workshop, Madison, Wisconsin, USA 26.–31.07

Simon, C. O., N. K. A. Grzimek-Koschewa, R. Holtappels, and M. J. Reddehase. 2002. Generation of recombinant cytomegaloviruses with point mutations in the C-terminal MHC-anchor residue of an immunodominant antigenic peptide. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Erlangen, 08.–11.04