

**Bedeutung der viralen IE4-Region für
die Genexpression und Replikation des
humanen Cytomegalovirus**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie

Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Kai Alexander Kropp

geboren am 26 September 1977

in Neustadt a. d. Weinstrasse

Mainz, 2007

Tag der mündlichen Prüfung: 17.01.2008

Zusammenfassung:

Das humane Cytomegalovirus (HCMV) ist ein fakultativ-pathogener Erreger, der bei Patienten mit geschwächter oder unausgereifter Immunabwehr schwerwiegende Erkrankungen hervorrufen kann. Wie alle Herpesviren zeigt das HCMV eine streng koordinierte Expression viraler Gene, die in eine „sehr frühe-“ (IE), „frühe-“ (E) und „späte-“ (L) Phase unterteilt werden kann. Die Produkte der IE-Gene IE1 und IE2 sind für die Expression der frühen Gene und somit für die Initiation der viralen DNA-Replikation entscheidend. Sie greifen gleichzeitig in den zellulären Stoffwechsel ein und schaffen damit optimale Voraussetzungen für die virale Vermehrung. Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass HCMV in lytisch infizierten Zellen ein abundantes IE-Transkript von 5 kb (IE4-RNA) exprimiert, dessen Funktion bislang unklar war. Ältere Publikationen deuteten darauf hin, dass die IE4-Genregion an der Transformation eukaryonter Zellen beteiligt sein könnte. Neuere Arbeiten zeigten, dass es sich bei diesem IE4-Transkript um ein metabolisch stabiles Intron handelt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst geklärt werden, ob die IE4-Genregion ein Protein kodiert. In der Folge sollten mit viralen Deletionsmutanten Hinweise auf die biologische Funktion des IE4-Bereichs erarbeitet werden. Durch Northern Blot Analysen und cDNA-Klonierungsexperimente konnte eine Reihe neuer Spleiß-Varianten der IE4-RNA identifiziert werden. Durch Sequenzanalysen wurde gezeigt, dass diese Transkripte keine längeren offenen Leserahmen enthalten. Zusammen mit bereits publizierten Erkenntnissen, kann aus diesen Ergebnissen mit hoher Wahrscheinlichkeit geschlossen werden, dass die IE4-Region nicht für ein Protein kodiert. Zur Analyse der biologischen Funktion der IE4-Region wurde das DNA-Genom des HCMV gezielt mutagenisiert. Eine phänotypische Analyse der entsprechenden Viren mittels Reporter-Gen-Tests und quantitativer *RealTime* RT-PCR zeigte, dass einige der Mutanten eine verringerte Expression früher Gene aufwiesen, die mit einer Beeinträchtigung ihrer Replikationsfähigkeit in Fibroblastenkulturen korrelierte. Dabei war die Ausbildung eines Phänotyps jedoch von dem genetischen Hintergrund des verwendeten viralen Ausgangsstammes abhängig. Auffällig war, dass phänotypische Veränderungen nur bei solchen Mutanten sichtbar wurden, die auf der Grundlage des Laborstammes Ad169 des HCMV generiert worden waren. Die nachfolgende Analyse der Ausgangsstämme ergab deutliche Unterschiede in der IE-Genexpression. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen somit, dass die IE4-RNA mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht für ein Protein kodiert, aber bei limitierender Expression der essentiellen Regulatoren IE1 und IE2 die frühe lytische Genexpression stimuliert. Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen die Grundlage für nachfolgende Untersuchungen zur Aufklärung der molekularen Funktion der IE4-RNA im Rahmen der lytischen Infektion des HCMV dar.

Für Franka

1. EINLEITUNG	1
1.1. Das humane Cytomegalovirus	1
1.1.1. Die Familie der <i>Herpesviridae</i>	1
1.1.2. Epidemiologie	2
1.1.3. Immunreaktion und Pathenogenese	3
1.1.4. Morphologie	6
1.1.5. Replikationszyklus	8
1.1.6. Regulation der Genexpression	12
1.1.7. Nicht-kodierende RNAs des HCMV	16
1.2. Das IE4-Transkript des HCMV	18
1.3. Gegenstand der Arbeit	19
2. MATERIAL UND METHODEN	21
2.1. Allgemeine Laborgeräte	21
2.2. Chemikalien	22
2.3. Bakterien und ihre Kultivierung	22
2.3.1. Verwendete Bakterienstämme	22
2.3.2. Medien und Medienzusätze	23
2.3.3. Kultivierung	23
2.3.4. Kryokonservierung	24
2.3.5. Transformation	24
2.4. Säugerzellen und ihre Kultivierung	25
2.4.1. Kultivierung	25
2.4.2. Verwendete Zellen und Zelllinien	27
2.4.3. Zellzahlbestimmung und Vitalitätstest	27
2.4.4. Kryokonservierung	28
2.4.5. Transfektion	28
2.4.6. Apoptosemessung	30
2.4.7. Messung der Luciferase-Aktivität	31
2.5. Viren und ihre Kultivierung	32
2.5.1. Verwendete Virusstämme	32
2.5.2. Rekonstitution aus BACmiden	35
2.5.3. Infektion von Säugerzellen	35
2.5.4. Herstellung virushaltiger Überstände	36

2.5.5.	Bestimmung des Virustiters.....	36
2.5.6.	Analyse der Virusreplikation.....	37
2.6.	Isolation, Manipulation und Analyse von Nukleinsäuren.....	38
2.6.1.	Verwendete Plasmide	38
2.6.2.	Verwendete Oligonukleotide	41
2.6.3.	Isolation von DNA.....	41
2.6.4.	Isolation von RNA.....	43
2.6.5.	Bearbeiten von Nukleinsäuren	43
2.6.6.	BAC-Mutagenese	45
2.6.7.	Gelelektrophorese	47
2.6.8.	Gelelution	48
2.6.9.	Polymerase Kettenreaktion	49
2.6.10.	Quantitative <i>Real-Time</i> PCR.....	51
2.6.11.	Quantitative <i>Real-Time</i> RT-PCR.....	53
2.6.12.	Genomquantifizierung mit einer TaqMan™ Sonde.....	53
2.6.13.	Transkriptquantifizierung mit SYBR-GREEN	55
2.6.14.	Southern Blot.....	62
2.6.15.	Northern Blot	64
2.6.16.	Markierung von Nukleinsäuren.....	64
2.7.	Analyse von Proteinen	65
2.7.1.	Quantitative Bestimmung der Proteinmenge	65
2.7.2.	Verwendete Antikörper.....	66
2.7.3.	Indirekte Immunfluoreszenz	66
2.7.4.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	67
2.7.5.	Western Blot.....	68
3.	ERGEBNISSE	69
3.1.	Analyse möglicher offener Leserahmen im IE4 Bereich	69
3.1.1.	Northern Blot Analyse der IE4 Genregion.....	69
3.1.2.	Strukturelle Analyse der IE4-Transkripte mittels cDNA-Synthese	72
3.1.3.	Eingrenzung der 5´- 3´-Enden der alternativen IE4-Transkripte	75
3.1.4.	Identifikation eines möglichen Genproduktes mittels heterologer Expression des IE4-Bereichs	77
3.2.	Funktionelle Analyse des IE4-Gens anhand von viralen Deletionsmutanten .	82
3.2.1.	Analyse des Wachstumsverhaltens der IE4-Deletionsmutanten	83
3.2.2.	Untersuchung der frühen Gen Expression im Luciferase-Test.....	85

3.2.3.	Quantitative Analyse der Genexpression	87
3.2.4.	Einfluss des IE4-Bereichs auf Apoptose in HFF	91
3.3.	Kotransfektion von IE1/IE2-Expressionsplasmiden mit IE4- Expressionsplasmiden	94
3.4.	Analyse der IE4 Genregion des HCMV mittels Mutagenese des viralen Genoms in <i>E. coli</i>	96
3.4.1.	Herstellung von Mutanten des HCMV mittels BAC-Mutagenese	96
3.4.2.	Strukturelle Analyse der BAC-Mutanten	101
3.4.3.	Analyse der Replikationsfähigkeit der BAC-Mutanten	104
3.4.4.	Untersuchung der frühen Genexpression der BAC-Mutanten im Luciferase- Test	106
3.4.5.	Quantitative Analyse der Genexpression in infizierten HFF mittels <i>Real-Time</i> RT-PCR	110
3.4.6.	Vergleich der IE1/IE2 Expression in RV-HB5 und Ad169	115
4.	DISKUSSION	117
4.1.	Identifizierung möglicher Genprodukte des IE4-Bereichs	119
4.1.1.	Heterologe Expression des IE4-Bereichs	122
4.2.	Analyse der IE4-Genregion mit Hilfe viraler Deletionsmutanten	122
4.2.1.	Replikationsverhalten der IE4-Deletionsmutanten	123
4.2.2.	Untersuchung der Aktivität der UL97- und UL112/113-Promotoren mit Hilfe des Luciferase-Reportergens	125
4.2.3.	Analyse der Expression ausgewählter früher Gene durch quantitative <i>Real-</i> <i>Time</i> RT-PCR	126
4.2.4.	Vergleich der IE1/IE2 Expression in RV-HB5 und Ad169	129
4.3.	Mögliche Funktionsmechanismen des IE4-Introns	130
5.	LITERATURVERZEICHNIS	133
6.	ANHANG	144
6.1.	Verwendete Oligonukleotide	144
6.2.	Plasmidkarten	148
7.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	150

1. Einleitung

1.1. Das humane Cytomegalovirus

1.1.1. Die Familie der *Herpesviridae*

Das humane Cytomegalovirus (HCMV) ist einer der neun human-pathogenen Vertreter der Familie *Herpesviridae* und gehört zur Subfamilie der β -*Herpesvirinae*. Zur Familie der Herpesviren gehören Erreger, die Wirte in den Gruppen der Weichtiere (*Malacoherpesviridae*), der Fische und Amphibien (*Alloherpesviridae*) bis hin zu Reptilien, Vögeln und Säugetieren (*Herpesviridae*) infizieren (McGeoch & Gatherer, 2005; McGeoch *et al.*, 2006). Alle Mitglieder dieser Virusfamilie weisen gemeinsame morphologische und biologische Merkmale auf. Sie besitzen ein doppelsträngiges lineares DNA-Genom von 124 bis 230 kb, das in ein ikosahedrales Kapsid aus 162 Kapsomeren verpackt wird. Die Kapside der Herpesviren werden von einer variabel geformten Proteinhülle umschlossen, die man als Tegument bezeichnet. Diese Struktur wird von einer Lipidmembran zellulären Ursprungs umhüllt, in die virale Glykoproteine eingebettet sind (Abb. 1.1).

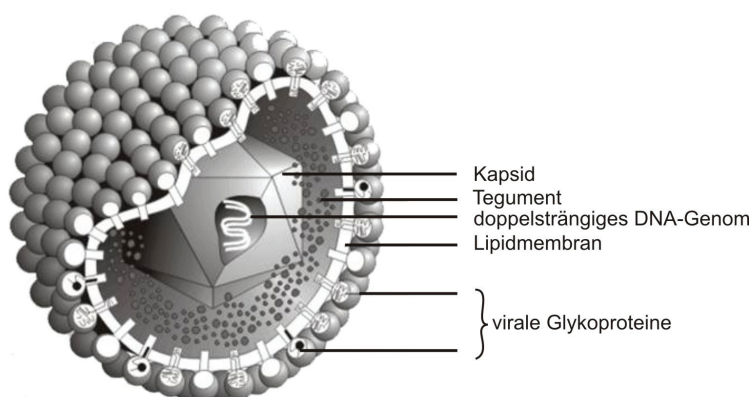


Abb. 1.1

Schematische Darstellung eines HCMV-Partikels.

Quelle:

Dr. Marko Reschke, Marburg

Neben den morphologischen Ähnlichkeiten weisen die Mitglieder der *Herpesviridae* auch biologische Gemeinsamkeiten auf. So exprimieren alle Vertreter eine Reihe von viruseigenen Enzymen, die den Nukleinsäurestoffwechsel (Thymidinkinasen, dUTPasen, Ribonukleotidreduktasen), die DNA-Replikation (DNA-Polymerase und Prozessivitätsfaktoren) und die Modifikation von Proteinen (Proteinkinasen) beeinflussen bzw. weitgehend unabhängig von den zellulären homologen Proteinen ermöglichen. Die Synthese der viralen Genome und die Beladung von Kapsiden mit den viralen Genomen findet ausschließlich im Zellkern statt, während die endgültige Reifung der Viruspartikel

im Zytoplasma erfolgt. Herpesviren sind lytische Viren, ihr Replikationszyklus ist schlussendlich mit der Zerstörung der infizierten Zelle verbunden. Alle Herpesviren etablieren Latenz, die, soweit untersucht, mit der episomalen Persistenz des viralen Genoms in der Zelle einhergeht. In latent infizierten Zellen werden nur ausgewählte Gene exprimiert. Die virale Latenz kann durch Reaktivierungsereignisse unterbrochen werden, die zur Induktion der lytischen Genexpression und zur Freisetzung von Tochterviren führen (Roizmann *et al.*, 1992).

Neben diesen Gemeinsamkeiten weisen die verschiedenen Herpesviren jedoch auch große Unterschiede in ihren biologischen Funktionen auf, die eine Einteilung in drei Subfamilien ermöglichen. In die Subfamilie der α -*Herpesvirinae* reiht man von den humanpathogenen Vertretern die Herpes Simplex Viren Typ 1 (HSV-1) und Typ 2 (HSV-2) und das Varizella Zoster Virus (VZV) ein. Sie zeichnen sich durch ein vergleichsweise variables Wirtsspektrum, einen relativ kurzen Replikationszyklus, eine sehr schnellen Ausbreitung in Zellkultur und eine effektive Zerstörung infizierter Zellen aus. Alle α -Herpesviren besitzen die Fähigkeit zur Etablierung von Latenz in sensorischen Ganglien.

Das HCMV stellt den Prototyp der Subfamilie der β -*Herpesvirinae* dar. Neben diesem zählen noch die humanen Herpesviren-6 (HHV-6) und 7 (HHV-7), sowie das murine CMV und andere tierpathogene Stämme zu den β -Herpesviren. Die Hauptcharakteristika dieser Virusfamilie sind ihre strikte Speziespezifität und ihr langer Replikationszyklus in Zellkultur. Mit β -Herpesviren infizierte Zellen nehmen häufig an Größe zu und bilden Riesenzellen (Cytomegalie). Die Progression der Infektion in Zellkultur ist im Gegensatz zu den α -Herpesviren langsam. Mitglieder dieser Familie können Latenz beispielsweise in den Speicheldrüsen, den Nieren, den Lungen und lymphatischen Zellen etablieren.

Auch die Mitglieder der γ -*Herpesvirinae* (z.B. Epstein-Barr-Virus [EBV] und das humane Herpesvirus 8 [HHV-8]) weisen ein sehr enges Wirtsspektrum auf und replizieren in lymphatischen Zellen. Diese Viren infizieren in der Regel nur einen Typ lymphatischer Zellen (entweder T-Lymphozyten oder B-Lymphozyten), die auch den Ort der Latenz darstellen (Pellet & Roizmann, 2007).

1.1.2. Epidemiologie

Das humane Cytomegalovirus ist ein ubiquitär verbreitetes, fakultativ-pathogenes Virus. Das morphologische Korrelat der Infektion wurde erstmalig von dem deutschen Pathologen Ribbert an den Organen eines verstorbenen Frühgeborenen dokumentiert und nachfolgend publiziert (Ribbert, 1904). Das später CID (*Cytomegalic Inclusion*

Disease) benannte Krankheitsbild zeichnet sich durch den Nachweis von Riesenzellen mit Einschlusskörperchen (Eulenaugen-Zellen) in den Geweben verschiedener Organe, wie den Speicheldrüsen, der Leber, den Nieren, der Lunge und der Bauchspeicheldrüse aus. Erst im Jahre 1956 wurde das HCMV praktisch zeitgleich von drei Gruppen isoliert und als verursachendes Agens der CID identifiziert (Rowe *et al.*, 1956; SMITH, 1956; Craig *et al.*, 1957).

Die ubiquitäre Verbreitung des HCMV lässt sich durch die Prävalenz von Antikörpern gegen das Virus im Serum der erwachsenen Bevölkerung gut verfolgen. Dabei hängt der Grad der Durchseuchung der jeweils untersuchten Bevölkerungsgruppen stark von deren sozialen und ökonomischen Status ab. In Entwicklungsländern in Afrika und Asien weisen bis zu 100% der Bevölkerung Antikörper gegen das HCMV auf, während die Seroprävalenz in Industrienationen deutlich niedriger ist (50% - 70%) (Mocarski-ES *et al.*, 2007).

Übertragungswege

Das HCMV kann sowohl vertikal wie auch horizontal zwischen Individuen übertragen werden. Der horizontale Transfer erfolgt durch direkten Schleimhaut-Kontakt mit kontaminierten Körperflüssigkeiten infizierter Personen, wie beispielsweise Speichel, Zervikalsekret, Samenflüssigkeit und Urin. Die hauptsächlichen Ansteckungsquellen für Erwachsene sind daher infizierte Sexualpartner oder Kinder im Kindergarten- oder Schulalter. Betreuer in Kindertagesstätten weisen so durch den verstärkten Kontakt zu infizierten Kindern eine zur Normalbevölkerung erhöhte Durchseuchungsrate mit HCMV auf. Eine weitere Möglichkeit des horizontalen Transfers stellt die Transplantation von infizierten Organen und Geweben, bzw. die Verwendung von kontaminierten Blutkonserven dar. Die Infektion von Neugeborenen bzw. Säuglingen kann sowohl diaplazentar, wie auch peri- bzw. postnatal durch die Mutter erfolgen. So stellt Stillen ein erhebliches Risiko für die Übertragung von der Mutter auf das Kind dar (Landolfo *et al.*, 2003; Mocarski-ES *et al.*, 2007).

1.1.3. Immunreaktion und Pathogenese

Die durch eine Infektion mit HCMV ausgelöste Immunantwort ist in der Regel stark, lang anhaltend und erfolgt auf vielen Ebenen des Immunsystems. Der Verlauf einer HCMV-Primärinfektion ist in den meisten Fällen asymptomatisch, kann aber gelegentlich (~10% der primären Infektionen) zu mononukleoseähnlichen Symptomen und auch vereinzelt zu schweren Verläufen führen. Die Kontrolle einer HCMV-Infektion erfolgt durch ein

Zusammenspiel der angeborenen und der erworbenen Immunabwehr. Die initiale Reaktion erfolgt durch Komponenten des angeborenen Immunsystems. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass Interferone (IFN) und Natürliche Killer-(NK) Zellen für eine effektive und schnelle Kontrolle der Infektion wichtig sind (Robbins *et al.*, 2006). Während der Infektion werden neutralisierende Antikörper gegen das HCMV gebildet (Rapp *et al.*, 1992; Alberola *et al.*, 2000). Da HCMV sich in erster Linie zell-assoziiert im Wirtsorganismus verbreitet (z. B. durch infizierte Leukozyten), können Antikörper gegen virale Glykoproteine der Virushülle die Ausbreitung im Körper nur eindämmen aber nicht verhindern. Bei Frühgeborenen können mütterliche Antikörper Schutz gegen eine Ausbildung von Symptomen vermitteln (Yeager *et al.*, 1981). Die Gabe hoher Dosen antiviraler Antikörper während der Schwangerschaft, scheint die Wahrscheinlichkeit einer diaplazentalen Übertragung zu verringern (Nigro *et al.*, 2005). Eine wichtige Funktion von neutralisierenden Antikörpern ist somit vermutlich der Schutz Neugeborener, die bis zur Ausreifung ihres Immunsystems auf Immunglobuline der Mutter angewiesen sind. Die bedeutendsten Komponenten des Immunsystems zur Kontrolle einer HCMV-Infektion stellen T-Lymphozyten dar. Sowohl im Tiermodell (Reddehase *et al.*, 1985; Kosinowski *et al.*, 1990) wie auch bei Patienten mit beeinträchtigter zellulärer Immunantwort, konnte gezeigt werden, dass zytotoxische CD8⁺- und CD4⁺-T-Lymphozyten essentiell für die Kontrolle primärer und reaktivierter Infektionen sind (Walter *et al.*, 1995; Hakki *et al.*, 2003). Die Bedeutung der zellulären Immunantwort für die Kontrolle der HCMV-Infektion wird auch durch die Tatsache gestützt, dass das HCMV-Genom für eine große Gruppe von Genprodukten kodiert, die in verschiedene Schritte der zellulären Immunantwort eingreifen und die Eliminierung der infizierten Zelle verhindern können (Mocarski, 2002). Mehr als 25 Genprodukte wurden bisher beschrieben, die eine Replikation des HCMV trotz antiviraler Faktoren des Wirts ermöglichen. Es sind beispielsweise Proteine bekannt, die die Repression der viralen Transkription verhindern, die Induktion von Apoptose blockieren oder mit den IFN-Signalwegen interferieren. HCMV exprimiert daneben auch Glykoproteine (gpUS2, gpUS3, gpUS6 und gpUS11) welche die Präsentation viraler Peptide im Kontext von MHC I beeinträchtigen. Es wird vermutet, dass diese viralen Immunmodulatoren es ermöglichen, dass trotz der Induktion einer schützenden Immunantwort das HCMV im Körper für längere Zeit persistent repliziert und damit über längere Zeit hinweg ausgeschieden werden kann. Dies ermöglicht eine effektive Verbreitung des Virus in der Bevölkerung (Landolfo *et al.*, 2003; Mocarski-ES *et al.*, 2007).

Von seltenen schweren Verlaufsformen abgesehen, wird die HCMV-Infektion nur dann klinisch auffällig, wenn das Immunsystem des Patienten geschwächt oder unausgereift

ist. Infektionen im Säuglings- und Kleinkindesalter (peri- bzw. postnatal), verlaufen daher bei reifen Kindern im Normalfall asymptomatisch. Diese asymptomatische Infektion wird jedoch gegebenenfalls von protrahierter Virusausscheidung begleitet. Etwa 90% der pränatal infizierten Säuglinge sind zunächst klinisch unauffällig, entwickeln jedoch in 7-25% der Fälle neuronale Spätfolgen, wie geistige Retardierung oder Beeinträchtigungen des Gehörs. Etwa 5-10% der kongenital infizierten Kinder zeigen bereits bei der Geburt Symptome ihrer HCMV-Infektion. In dieser Gruppe finden sich bei bis zu 90% dieser Säuglinge neuronale Spätfolgen, wie geistige Retardierung, Hörverlust und Beeinträchtigung des visuellen Systems. 10% der bei Geburt symptomatischen Kinder versterben innerhalb des ersten Lebensjahres (Mocarski-ES & Courcelle, 2001; Landolfo *et al.*, 2003; Mocarski-ES *et al.*, 2007).

Die iatrogene Immunsuppression im Rahmen der Transplantation von soliden Organen (SOT) oder von hämatopoetischen Stammzellen (HSCT) fördert die Reaktivierung der latenten HCMV-Infektion. In der Folge einer solchen Reaktivierung treten gehäuft Organmanifestationen an Lunge, Darm, Retina, Nieren, Speiseröhre, ZNS oder anderen Organen auf, die einen lebensbedrohlichen Verlauf nehmen können (Mocarski-ES & Courcelle, 2001; Mocarski-ES *et al.*, 2007). Auch kann eine HCMV-Infektion bei SOT zu Dysfunktionen oder Abstoßung des transplantierten Organs führen. Das Risiko hierfür kann durch die Gabe antiviraler Medikamente verringert werden (Hodson *et al.*, 2005). Untersuchungen *in vitro* und im Rattenmodell zeigen, dass eine Replikation in den Endothelzellen der Blutgefäße des Transplantats eine Rekrutierung glatter Muskelzellen und eine allogene Stimulation des Immunsystems verursachen. Dies scheint zu einer Schwellung der Gefäßwände und daraus folgend zu einer Unterversorgung des Organs und dessen Versagen zu führen (Streblow *et al.*, 2007).

Neben Transplantatempfängern sind Patienten mit erworbenem Immundefizitssyndrom (AIDS) empfänglich für schwere HCMV-Infektionen. Hier hat jedoch die Einführung hochaktiver, antiretroviraler Therapiestrategien (HAART) einen wesentlichen Fortschritt erbracht, sodass in der Folge der retroviralen Suppression auch schwere HCMV Infektionen seltener beobachtet werden (Mocarski-ES *et al.*, 2007).

1.1.4. Morphologie

Die Virionen des HCMV weisen eine für Herpesviren typische Struktur auf (siehe Abb. 1.1). Die strukturellen Komponenten des HCMV-Partikels werden im Folgenden näher beschrieben.

Genom

Das lineare doppelsträngige DNA-Genom des HCMV besteht aus ungefähr 235 kbp. Zwei zentrale, jeweils in einer Kopie vorliegende Genomabschnitte, die als *Unique_{Long}* (U_L) und *Unique_{Short}* (U_S) bezeichnet sind, werden jeweils von repetitiven Sequenzen (*Repeat_{Long}* und *Repeat_{Short}*) flankiert. (Abb. 1.2). Diese Anordnung führt während der Replikation zu Rekombinationen zwischen den jeweiligen Sequenzwiederholungen, wodurch die Orientierungen der U_L und U_S Abschnitte zueinander variieren können. Aus diesem Grund liegt in einer Viruspräparation ein äquimolares Gemisch aus den vier möglichen Isoformen des Genoms vor. Seit der ursprünglichen Sequenzierung und Annotation der offenen Leserahmen (ORFs) des HCMV (Chee *et al.*, 1990) wurden durch bioinformatische Analysen 252 putative ORFs mit mindestens 80 Aminosäuren (aa) Länge beschrieben (Murphy *et al.*, 2003b), wobei verschiedene Arbeiten 166 (Dolan *et al.*, 2004; Davison & Stow, 2005) bzw. 192 ORFs (Murphy *et al.*, 2003a) mit hohem Kodierungspotenzial angeben. Eine Gruppe von 70 ORFs scheint in allen Mitgliedern der *β -Herpesvirinae* konserviert zu sein und 40 dieser ORFs sind in der gesamten Familie der *Herpesviridae* zu finden (Mocarski-ES *et al.*, 2007).

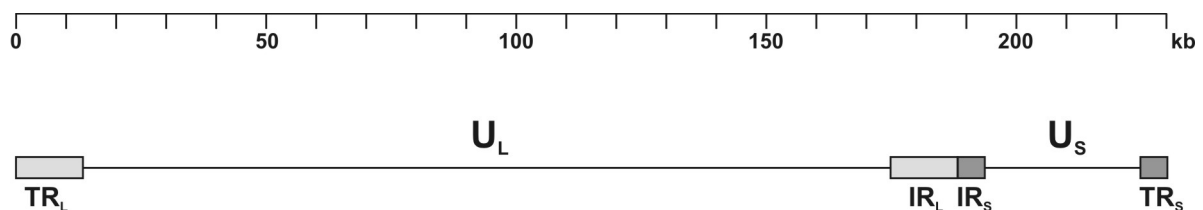


Abb.1.2:

Schematische Darstellung der Struktur des HCMV-Genoms. Die abgebildete Skala in Kilobasenpaaren (kb) dient dem Größenvergleich. Das 235 kb HCMV-Genom ist in je einen langen (U_L) und einen kurzen (U_S) zentralen Bereich gegliedert, der jeweils von eigenen intern (IR_L , IR_S) und terminal (TR_L , TR_S) angeordneten invertierten Sequenzwiederholungen (*Repeats*, graue Rechtecke) flankiert werden.

Viruskapsid

Das Kapsid des HCMV weist eine ikosahedrale Symmetrie auf. Es ist aus 162 Kapsomeren (150 Hexone, 12 Pentone) aufgebaut, die von 2 Proteinen gebildet werden. Es handelt sich hierbei um das *Major Capsid Protein* (MCP, 955 Kopien), das *Smallest Capsid Protein* (SCP, 900 Kopien). Ein heterotrimerer Komplex (322 Kopien) aus den Proteinen *minor Capsid Protein* (mCP) und dem mCP-Bindeprotein (mCP-BP) im Verhältnis von 2:1, bildet die Verbindungen zwischen den Hexonen und Pentonen. 12 Kopien des PORT Proteins bilden ein spezielles Kapsomer, das für das Einschleusen des Virusgenoms in das Kapsid verantwortlich ist (Chen *et al.*, 1999). In infizierten Zellen lassen sich mittels elektronenmikroskopischer Darstellung drei Typen von Kapsiden nachweisen, die als A-, B- und C-Kapside bezeichnet werden. A-Kapside bestehen nur aus der leeren Kapsidhülle und stellen fehlerhafte nicht beladene Kapside dar, B-Kapside sind Kapside ohne DNA, deren Reifung noch nicht über den Prozess des *Assembly* hinausgegangen ist (Butcher *et al.*, 1998). C-Kapside stellen mit DNA beladene Kapside dar, die zu reifen Virionen weiter prozessiert werden (zusammengefasst in (Mocarski-ES *et al.*, 2007)).

Tegument

Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie lässt sich im Raum zwischen der Virushülle und dem Kapsid eine elektronendichte, das Kapsid umhüllende Struktur erkennen, die als Tegument bezeichnet wird. Diese scheinbar amorphe Proteinschicht besteht aus einigen RNA-Molekülen (Bresnahan & Shenk, 2000) und bisher 24 identifizierten viralen Proteinen, von denen einige stark phosphoryliert vorliegen (Jahn & Mach, 1990). Das Tegument macht einen großen Teil (40%) der Gesamtmasse des Virions aus und enthält immunogene Proteine (z.B. ppUL32 [pp150] und ppUL83 [pp65]) (Varnum *et al.*, 2004). Zwei Genfamilien kodieren für den größten Teil der Tegumentproteine, die UL82-Genfamilie (UL82, UL83, UL32 und UL48) und die US22-Genfamilie (UL23, UL24, UL36, UL43, IRS1, US22 und TSR1). Die tatsächliche Struktur des Teguments konnte noch nicht aufgeklärt werden. Jedoch wurden bereits mehrere Tegumentproteine identifiziert, die spezifische Bindungen mit Komponenten des Kapsids eingehen (ppUL32, ppUL47) und untereinander oder mit der Virushülle interagieren (pp28). Dies lässt eine komplexe Struktur des Teguments vermuten, die in kryo-elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Chen *et al.*, 1999) bisher erst ansatzweise dargestellt werden konnte (zusammengefasst in (Mocarski-ES *et al.*, 2007)).

Virushülle

Die äußerste Schicht des Virions, die Virushülle, besteht aus einer Lipid-Doppelmembran zellulären Ursprungs, in der bisher acht virale Glykoproteine als strukturelle Komponenten identifiziert werden konnten (Varnum *et al.*, 2004; Britt & Boppana, 2004). Diese Membran stammt aus einem zytoplasmatischen Kompartiment, vermutlich dem ERGIC (*ER Golgi Intermediate Compartment*), in dem das für die Umhüllung der Virionen essentielle Tegumentprotein pp28 lokalisiert ist (Sanchez *et al.*, 2000; Seo & Britt, 2007). Es konnten bisher drei Glykoproteinkomplexe identifiziert werden, die essentiell für die Bindung an die Zelloberfläche und die Penetration der Zellmembran sind und bei Herpesviren konserviert sind (Kinzler & Compton, 2005). Der erste Komplex *gcI* besteht aus einem einzelnen gB-Homodimer (gpUL55). Der zweite Komplex *gcII* liegt meist als Heterodimer aus den Glykoproteinen gH (gpUL75) und gL (gpUL115) vor, es sind aber auch Trimere aus gH, gL und gO (gpUL74) oder anderen viralen Proteinen der Virushülle bekannt. Der dritte Komplex *gcIII* wird von den Glykoproteinen gM (gpUL100) und gN (gpUL73) gebildet. Diese Komplexe werden alle durch das Immunsystem erkannt und bilden Zielstrukturen für neutralisierende Antikörper (Boehme & Compton, 2006; Mocarski-ES *et al.*, 2007).

1.1.5. Replikationszyklus

Der Replikationszyklus des HCMV beginnt mit der Adsorption der Viruspartikel an die permissive Wirtszelle. Das HCMV kann *in vivo* z. B. in Endothel- oder Epithelzellen, dendritischen Zellen, Makrophagen, glatten Muskelzellen, neuronalen Zellen und Hepatozyten replizieren. In Kulturzellen weist HCMV ein deutlich eingeschränktes Wirtszellspektrum auf, wobei nur primäre Fibroblasten die effektive Virusvermehrung unterstützen (Sinzger *et al.*, 1995). Vollständige Replikation ist auch in primären Endothelzellen, pigmentierten Epithelzellen der Retina oder in Glioblastom-Zelllinien wie z.B. MG-U373 möglich, wenn auch mit deutlich reduzierter Effizienz im Vergleich zu Fibroblasten. Durch Fibroblasten-Passage verlieren primär endotheliotrope Virusisolate häufig die Fähigkeit zur Vermehrung in Endothelzellen (Prichard *et al.*, 2001). In der Konsequenz sind auch die gängigen Laborstämme, die primär auf Fibroblastenkulturen isoliert wurden, nicht mehr in Endothelzellkulturen passagierbar (Wang & Shenk, 2005). Dies wird durch die Inaktivierung bzw. den Verlust der Gene UL128, UL130 und UL131 verursacht (Boehme & Compton, 2006; Mocarski-ES *et al.*, 2007).

Aufgrund des breiten Wirtszell-Spektrums *in vivo* wird postuliert, dass die zellulären Rezeptoren des viralen Partikels ubiquitär exprimiert werden. Allerdings ist es bislang

nicht gelungen, den oder die HCMV Rezeptoren auf der Zelloberfläche eindeutig zu benennen. Als gesichert gilt jedoch, dass der erste Schritt der Interaktion zwischen viralem Partikel und der Wirtszelle durch eine lockere Bindung der viralen Glykoproteine gB und gM an Heparansulfatproteoglykane (HSPG) zustande kommt (Compton *et al.*, 1993). Diese lockere Bindung wird durch eine stärkere Interaktion mit einem unbekanntem Rezeptormolekül abgelöst. Für diesen Schritt ist das Glykoprotein gB essentiell notwendig. Die Proteine Annexin II (Wright *et al.*, 1994), *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) (Wang *et al.*, 2003) und CD13 (Soderberg *et al.*, 1993) interagieren mit löslichem gB und stellen mögliche virale Rezeptormoleküle dar. Jedoch konnte für keines dieser Moleküle bisher ein eindeutiger Nachweis ihrer Rezeptorfunktion geführt werden. Die Glykoproteine der Virushülle sind auch für den zweiten Schritt, die Penetration der Zellmembran, von essentieller Bedeutung (Kinzler & Compton, 2005). Die Komplexe *gC1* und *gC2* sind an der pH-unabhängigen direkten Fusion der viralen Hülle mit der zellulären Membran von Fibroblasten beteiligt. Da Antikörper gegen Integrine die Bindung der Virionen nicht blockieren, wohl aber das Eindringen des Virus in die Wirtszelle verhindern, liegt die Vermutung nahe, dass β_1 -Integrine eine wichtige Rolle als Interaktionspartner der Komplexe bei der Membranfusion spielen (Feire *et al.*, 2004).

Im Falle der Infektion von Endothel- oder Epithelzellen werden die Partikel zunächst über Endozytose aufgenommen. In der Folge kommt es zur Verschmelzung der viralen Hülle mit der Vesikelmembran. Dieser Vorgang ist pH-abhängig (Ryckman *et al.*, 2006) und wird durch Komplexe aus gH, gL und den Genprodukten von UL128, UL130 und UL131 vermittelt (Wang & Shenk, 2005). Nach der Fusion der Membranen wird das Kapsid mit Tegumentbestandteilen ins Zytoplasma freigesetzt und entlang des Zytoskeletts zum Zellkern transportiert. Es wird vermutet, dass dabei Bestandteile des Teguments die Interaktion mit den Mikrotubuli des Zytoskeletts vermitteln. Nach Kontakt des Partikels mit der äußeren Kernmembran wird das virale Genom vermutlich mit Hilfe des großen Tegumentproteins (LTP) und des LTP-Bindeproteins in den Zellkern eingeschleust (Mocarski-ES *et al.*, 2007).

Um die Replikation des Genoms zu ermöglichen, werden Zellzyklus und zellulärer Stoffwechsel durch virale Genprodukte (z. B. pp71, pUL69, IE1 und IE2) so beeinflusst, dass sich infizierte Zellen in einem S-Phase-ähnlichen Zustand befinden, der die Synthese viraler DNA unterstützt (Sanchez & Spector, 2006). Replizierende HCMV-Genome können immer in räumlicher Nähe zu ND10 Domänen detektiert werden, die sich unter dem Einfluss viraler Faktoren vermutlich zu Präreplikationsdomänen entwickeln (Maul *et al.*, 2000; Tang & Maul, 2006). Die Replikation des viralen Genoms

wird am lytischen Replikationsursprung (Ori_{Lyt}) in der U_L -Region initiiert. Sie erfolgt mit einem zirkulär vorliegenden Genom nach einem „*rolling circle*“ Mechanismus, durch den fortlaufend zusammenhängende virale Genome (Konkatemere) synthetisiert werden. Diese Konkatemere werden in der Folge gespalten und einzelne Genome in linearer Form in Kapside verpackt (Challberg & Kelly, 1989).

Das HCMV kodiert für mehrere virale Faktoren, die essentielle Aufgaben in den Proteinkomplexen der Replikationsgabel übernehmen. An diesen Prozessen sind eine zentrale Polymerase-Einheit (pUL54), ein Prozessivitätsfaktor (ppUL44), DNA-Einzelstrangbindepoteine (ppUL57) und eine heterotrimere Helicase (pUL105, pUL102, pUL70) beteiligt (Anders & McCue, 1996). Um die neu entstandenen Virusgenome in Viruspartikel zu verpacken, werden zunächst neue Kapside aufgebaut, wobei die Kapsomere um das pAP (*precursor-Assembly Protein*) herum angeordnet werden. Eine anschließende proteolytische Spaltung des pAP zu AP ermöglicht das Einschleusen viraler Genome in das Kapsid, wobei das AP aus dem Kapsid verdrängt wird. Dazu wird das freie Ende eines Konkatemers durch einen Proteinkomplex aus dem PORT-Protein (pUL104) und anderen viralen Faktoren erkannt und an einem DNA-Sequenzmotiv (*pac*) gebunden. Das Genom wird unter ATP-Verbrauch in das Kapsid geschleust, bis ein zweites *pac*-Motiv im *Terminal Repeat* (TR) des Genoms erreicht wird. Anschließend wird das Genom an dieser Stelle durch eine Endonuklease gespalten und im entstandenen C-Kapsid eingeschlossen (Gibson, 2006). Die abschließenden Schritte der Virusreifung im Zellkern sind vermutlich in allen α - und β -Herpesviren konserviert und laufen prinzipiell gleich ab. Die Ausschleusung aus dem Kern erfolgt durch einen konsekutiven Prozess des „*Envelopments*“ an der inneren und des „*De-Envelopment*“ an der äußeren Kernmembran. Die Details dieses so genannten „*Double Envelopment*“ wurden bislang vornehmlich am Beispiel des HSV-1 untersucht (Mettenleiter, 2002).

Die C-Kapside erhalten dabei einen Teil ihres Teguments bereits im Kern, wobei die endgültige Reifung der Partikel jedoch im Zytoplasma im ERGIC stattfindet. Um den Zellkern zu verlassen, knospen die Kapside in den perinukleären Raum. Hierbei spielen die Tegumentproteine pUL50 und pUL53 eine entscheidende Rolle. Die dabei erworbene Membran verschmilzt anschließend mit der äußeren Kernmembran, wodurch nicht umhüllte C-Kapside in das Zytoplasma entlassen werden. Diese werden zum ERGIC transportiert und erhalten dabei vermutlich ihr vollständiges Tegument. Die von Tegument umhüllten Kapside knospen anschließend in Vesikel, deren Membranen bereits mit viralen Glycoproteinen besetzt sind und erhalten dabei die virale Membranhülle. Diese mit umhüllten Virionen gefüllten Vesikel werden zur Zelloberfläche gebracht und entlassen dort reife Viren in die zelluläre Umgebung, wobei vermutlich nur

ungefähr 1% der freigesetzten Partikel auch infektiös ist (Mocarski-ES *et al.*, 2007). In etwa 99% der von einer infizierten Zelle im Zellkulturmodell freigesetzten Partikel werden von „*Dense Bodies*“, NIEPs (*Non Infectious Enveloped Particles*) und nicht infektiösen Virionen gebildet. Bei „*Dense Bodies*“ handelt es sich um mit einer viralen Membran umhüllte, amorphe Aggregate aus Tegument ohne ein Kapsid, die große Mengen (60%) des Proteins pp65 (ppUL83) enthalten (Varnum *et al.*, 2004). NIEPs bestehen aus umhüllten B-Kapsiden (Butcher *et al.*, 1998), die statt eines DNA-Kerns Aggregate des AP tragen (zusammengefasst in (Mettenleiter, 2004; Mocarski-ES *et al.*, 2007)).

Latenz

Wie bei allen Herpesviren wird auch im Falle von HCMV nach Primärinfektion lebenslange Latenz etabliert, die durch Phasen viraler Reaktivierung unterbrochen wird. Die Zielorgane der viralen Latenz sind bei HCMV unklar. In CD34⁺-haematopoetischen Stammzellen (HPCs) und daraus entstehenden myeloiden Vorläuferzellen konnte mit sensitiven Nachweismethoden virale DNA nachgewiesen werden (Mendelson *et al.*, 1996; Reeves *et al.*, 2005b). In Kokultivierungsexperimenten mit permissiven Fibroblasten konnte jedoch kein Reaktivierungsereignis in derart latent infizierten Stammzellen nachgewiesen werden. Die virale Reaktivierung kann *in vitro* durch die Differenzierung dieser Vorläuferzellen zu Makrophagen und dendritischen Zellen induziert werden (Taylor-Wiedeman *et al.*, 1994; Reeves *et al.*, 2005b). Reaktivierung von HCMV aus den Zellen infizierter Spender konnte durch allogene Stimulation erzielt werden. Die genauen Vorgänge bei der Reaktivierung von HCMV sind unbekannt (Söderberg-Naucler *et al.*, 1997; Söderberg-Naucler *et al.*, 2001). Neuere Untersuchungen deuten jedoch darauf hin, dass die im Zuge von Entzündungsreaktionen ausgeschütteten Zytokine und Chemokine, die z. B. den cAMP-Signalweg (Keller *et al.*, 2007) oder den NFκB-Signalweg aktivieren (Sambucetti *et al.*, 1989), hierbei eine Rolle spielen. Aktivierung dieser Signalwege führt unter anderem zur Differenzierung von HPCs zu Makrophagen, was wiederum die virale Reaktivierung unterstützt. Reaktiviertes Virus könnte in der Folge an permissive Gewebszellen weitergegeben werden, die die Virusvermehrung und Ausbreitung vermitteln. Nach einem aktuellen Modell (Reeves *et al.*, 2005a) hängt die virale Reaktivierung davon ab, dass die virale IE-Genexpression in hinreichender Weise angeschaltet wird, wie es bei HSV-1 und EBV bereits gezeigt werden konnte (Jenkins *et al.*, 2000; Kubat *et al.*, 2004). Es gibt Hinweise, dass die Expression der IE-Gene des HCMV in latent infizierten Zellen durch einen differenzierungs-abhängigen, chromatin-vermittelten Mechanismus

supprimiert wird (Murphy.J.C. *et al.*, 2002; Wright *et al.*, 2005). Abschnitte des HCMV-Genoms interagieren dabei in der Zelle mit Histonen und sollten daher der gleichen Regulation der Transkription wie die Chromosomen der Zelle unterliegen (*Histon-code hypothesis*, (Strahl & Allis, 2000)). In nicht-permissiven Zellen liegen die mit dem Bereich des „*Major immediate early promoter*“ (MIE-Promotor) assoziierten Histone deacetyliert und methyliert vor. In dieser Form binden Histone das Heterochromatin Protein (HP1) und erzeugen dadurch eine geschlossene Chromatinstruktur, die die IE-Genexpression unterdrückt (Reeves *et al.*, 2005a; Reeves *et al.*, 2005b). Die Differenzierung der Zelle durch Zytokine und Chemokine führt z. B. zu einer Aktivierung von NF κ B-abhängigen Genen durch den p38-MAPK Signalweg. Die Aktivierung dieses Signalwegs führt zu einer Phosphorylierung der mit dem MIEP assoziierten Histone. Daraufhin werden Histonacetylasen zu den Histonen rekrutiert, wodurch diese wieder acetyliert werden können und HP1 dissoziiert. Dies führt zu einer Öffnung der Chromatinstruktur des HCMV-Genoms und ermöglicht eine Aktivierung der IE-Genexpression und somit die Reaktivierung (Sinclair & Sissons, 2006; Bain *et al.*, 2006; Mocarski-ES *et al.*, 2007).

1.1.6. Regulation der Genexpression

Die Genexpression des HCMV ist streng reguliert und lässt sich grob in die drei Phasen IE (*immediate early* (α), sehr früh), E (*early* (β), früh) und L (*late* (γ), spät) einteilen. Die IE-Gene zeichnen sich durch ihre Expression unmittelbar nach der Infektion aus. Diese Expression ist von der Neusynthese viraler Proteine unabhängig. Das Tegument enthält virale Transaktivatoren, wie pp71 (ppUL82, *Viral Trans-Aktivator* [VTA]) oder ppUL35, die einen verstärkenden Einfluss auf die Aktivität der IE-Promotoren haben (Schierling *et al.*, 2004). Es wurden bisher vier verschiedene Genomregionen des HCMV beschrieben, in denen jeweils mehrere IE-Transkripte und Genprodukte kodiert werden. Diese Regionen kodieren verschiedene regulatorische Proteine (IE1, IE2, UL37x3, TRS1 und IRS1). Darüber hinaus werden die beiden anti-apoptotische Proteine vMIA (UL37x1, *viral Mitochondrial Inhibitor of Apoptosis*) (Goldmacher *et al.*, 1999), vICA (UL36, *viral Inhibitor of Caspase 8 Activation*) (Skaletskaya *et al.*, 2001) und das immunmodulatorische US3-Genprodukt (Ahn *et al.*, 1996) bereits in der IE-Phase exprimiert. Die Aktivierung der E-Gene ist definitionsgemäß abhängig von der *de novo* Synthese viraler Gene in der infizierten Zelle. Als wesentliche Transaktivatoren, die diesen Vorgang vermitteln, wurden die als IE1 und IE2 benannten Gene bzw. Proteine identifiziert (Spector, 1996; Meier & Stinski, 2006). Eine Expression von E-Genen kann bereits 2-6 h p.i. beobachtet werden, wobei die meisten E-Gene ihr

Expressionsmaximum zwischen 18 h und 24 h p.i. erreichen. Ein hoher Anteil der E-Genprodukte ist direkt oder indirekt an der Replikation des Virusgenoms und der anschließenden Verpackung in Kapside, sowie an anderen Schritten der viralen Morphogenese beteiligt. Andere E-Genprodukte beeinflussen den Stoffwechsel der Wirtszelle, den Zellzyklus oder die Immunantwort des Wirtes. Im Gegensatz zu IE- oder E-Genen ist bisher nur wenig über die Regulation von L-Genen des HCMV bekannt. Die L-Genprodukte sind in erster Linie an der Verpackung von Virusgenomen, dem Aufbau des Kapsids und des Teguments und der Freisetzung von Virionen beteiligt. Ein Kriterium zur Einordnung in die Gruppe der L-Gene ist neben der zeitlichen Kinetik eine Abhängigkeit der Expression von der Genomreplikation (*true late* (γ_2)). Nur ein geringer Teil von L-Genen erfüllt dieses Kriterium. Die Expressionskinetiken anderer L-Gene gleichen den Kinetiken der E-Gene und werden aufgrund ihrer Funktionen in die Gruppe der L-Gene eingeordnet (*leaky late* (γ_1)) (Mocarski-ES & Courcelle, 2001; Mocarski-ES *et al.*, 2007).

Funktionen der Immediate Early (α)-Gene IE1 und IE2

Die beiden viralen Transaktivatoren IE1 und IE2 sind die Hauptprodukte des MIE-Lokus im HCMV-Genom. Die Proteine IE1 p72 (auch IE1_{491aa} oder ppUL123) und IE2 p86 (auch IE2_{579aa} oder ppUL122) werden dabei durch mRNAs kodiert, die durch differentielles Spleißen entstehen. Beide Proteine werden z. B. durch Phosphorylierung und SUMOylierung posttranslational modifiziert (Harel & Alwine, 1998; Hofmann *et al.*, 2000; Spengler *et al.*, 2002). Das IE1 Protein ist nicht essentiell für die virale Replikation. Entsprechende Deletionsmutanten zeigen nur bei einer MOI<1 Beeinträchtigungen der viralen Genexpression (Greaves & Mocarski, 1998). Dem gegenüber ist das IE2 Protein für die virale Replikation unverzichtbar (Marchini *et al.*, 2001). Das IE1 p72 Protein beeinflusst durch multiple Interaktionen viele Aspekte des viralen Replikationszyklus. Es ist ein starker positiver Regulator der MIEP Aktivität und stimuliert zusammen mit IE2 synergetisch die Expression viraler E- und L-Gene, wobei es selbst jedoch nicht an DNA bindet. Durch Interaktionen mit zellulären Transkriptionsfaktoren beeinflusst es darüber hinaus die zelluläre Genexpression und den Zellzyklus. In der Literatur sind auch Hinweise auf antiapoptotische Eigenschaften (Yu & Alwine, 2002) und eine Inhibition der IFN-Antwort durch IE1 zu finden (Singh & Compton, 2004). Die Aktivierungsmechanismen des IE2 Transaktivators wurden bisher an drei Promotoren im Detail untersucht (UL112/113, UL54 und UL4) und diese stellen Prototypen IE2-abhängiger Promotoren dar. Alle weiteren bisher untersuchten Promotoren konnten einem dieser Prototypen zugeordnet werden. Promotoren der UL112/113-Typs enthalten

DNA-Motive, die direkt von IE2 durch DNA-Bindedomänen gebunden werden können. Promotoren der Typen UL54 und UL4 werden nicht direkt durch IE2 gebunden, sondern durch Transkriptionsfaktoren aktiviert, die mit IE2 interagieren. Im Gegensatz zu IE1 wirkt IE2 durch die direkte Bindung einer *cis repressing sequence* (crs) auch als Repressor auf den MIE Promotor (Lang & Stamminger, 1993). Neben seinen transaktivierenden Eigenschaften wurden auch antiapoptotische Effekte des IE2 Proteins beschrieben (Yu & Alwine, 2002) und ein Einfluss auf den Zellzyklus beobachtet. (Meier & Stinski, 2006; Mocarski-ES *et al.*, 2007).

Regulation des MIEP durch IE1/IE2 in ND10 Domänen

Zu sehr frühen Zeitpunkten nach einer Infektion mit HCMV können einige scheinbar widersprüchliche Vorgänge beobachtet werden (zur Übersicht siehe Abb. 1.3). Zum einen werden die viralen Genome im Zellkern schnell zu den so genannten ND10 Domänen (*PML-Bodies*) transportiert (Ishov *et al.*, 1997), die einen Teil der IFN-induzierten zellulären Abwehr gegen eindringende Viren darstellen (Möller & Schmitz, 2003). Diese ND10 Domänen bilden eine stark reprimierende Umgebung für virale Genome, da dort angereicherte Proteine, wie PML, Daxx, HP1 und HDAC die virale Genexpression unterdrücken (Xu *et al.*, 2001; Reeves *et al.*, 2005b; Preston & Nicholl, 2006). Trotzdem stellt die direkte Umgebung dieser Domänen anscheinend den Ort der viralen Genexpression und Genomreplikation dar (Ishov *et al.*, 1997; Ahn *et al.*, 1999). Die Aktivität des MIEP führt zur gleichzeitigen Bildung der beiden IE Proteine IE1 und IE2. Somit werden Genprodukte mit einer stimulierenden Aktivität (IE1) und einer reprimierenden Aktivität (IE2) auf den MIE-Promotor gleichzeitig exprimiert (Pizzorno *et al.*, 1988; Macias & Stinski, 1993). Dennoch wird die Aktivität des MIEP während der IE- und E- Phase der viralen Replikation aufrechterhalten. Es stellt sich also die Frage, welche Vorgänge oder viralen Faktoren eine Replikation des HCMV erlauben.

Die genauen Vorgänge an den ND10 Domänen sind weiterhin unbekannt. Das HCMV hat Mechanismen entwickelt, welche die reprimierenden ND10 Domänen auflösen und virale Replikationsdomänen ausbilden (Ahn *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2001). Dabei wird nach bisherigen Erkenntnissen die Ausbildung der geschlossenen Chromatinstruktur auf mehreren Stufen unterdrückt. Zunächst führt die Komplexbildung der Proteine pp71 und ppUL35 (Schierling *et al.*, 2004), die im Viruspartikel enthalten sind, mit Daxx zur Rekrutierung der Transaktivatoren pp71 und ppUL35 zu den ND10-Domänen (Ishov *et al.*, 2002; Hofmann *et al.*, 2002). Somit wird vermutlich auch die Daxx-abhängige Rekrutierung von HDACs (Hollenbach *et al.*, 2002) zum viralen Genom verringert und die Deacetylierung von Histon H3 vermindert. Vor dem Transport des Genoms in die ND10-

Domäne initial synthetisiertes IE1 Protein kann HDACs binden und dadurch ihre Aktivität verringern (Tang & Maul, 2003). Die IE1-HDAC Komplexe werden in die ND10 Domänen transportiert und dort festgehalten, bis zu späteren Zeitpunkten eine verstärkte IE1-Expression zur Auflösung dieser Domänen führt (Xu *et al.*, 2001). Die dadurch bewirkte räumliche Trennung von HDACs und den viralen Genomen sollte somit die Deacetylierung der Histone und die Rekrutierung des HP1 behindern (Abb. 1.3). Durch diese Vorgänge könnte die Ausbildung der geschlossenen Chromatinstruktur verhindert und eine weitere Transkription des MIE-Lokus ermöglicht werden (Tang & Maul, 2006; Bain *et al.*, 2006).

Ein weiteres unverstandenes Phänomen stellt die gleichzeitige Synthese der Proteine IE1 und IE2 dar. Das IE2 Protein ist ein autoregulativer Repressor der MIEP-Aktivität. Da IE2 jedoch auch ein essentieller Transaktivator früher und später viraler Gene ist, muss diese reprimierende Aktivität des IE2 Proteins selektiv unterdrückt werden. Ein aktuelles Modell geht davon aus, dass UL112/113 Genprodukte eine wichtige Rolle in der Steuerung der IE2 Aktivität spielen, da sie mit IE2 in ND10 Domänen kolokalisieren (Ahn *et al.*, 1999). Die homologen Genprodukte von M112/113 des MCMV zeigen eine solche

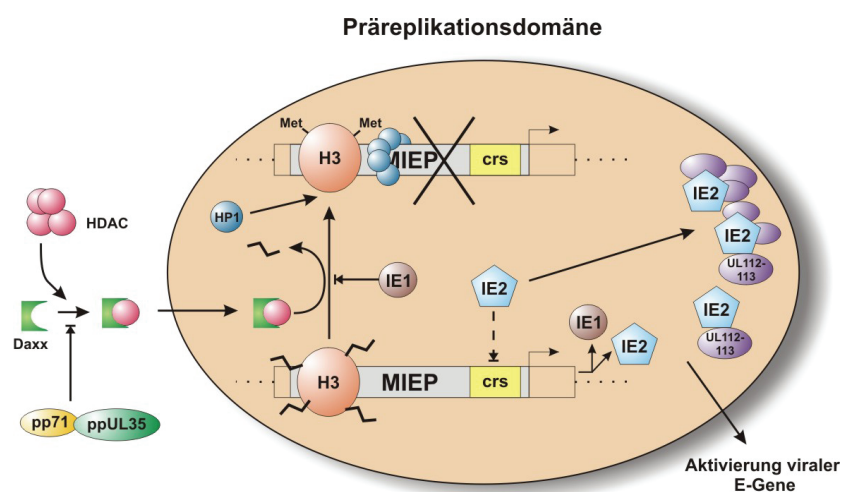


Abb 1.3:

Schematische Darstellung der hypothesierten Vorgänge in viralen Präreplikationsdomänen und der autoregulativen Funktionen der α -Genprodukte IE1 und IE2. In nicht permissiven Zellen wird die virale IE-Genexpression schnell unterdrückt. Dies geschieht wahrscheinlich durch die Ausbildung einer geschlossenen Chromatinstruktur durch zelluläre Faktoren wie Daxx, HDAC und HP1 die durch zelluläre Repressoren wie z. B. YingYang-1 zum MIEP rekrutiert werden. In permissiven Zellen werden diese zellulären Repressoren nicht oder nur geringfügig exprimiert. Bestandteile der viralen Partikel wie pp71 und ppUL35 verhindern zusammen mit dem durch eine initiale IE-Genexpression gebildeten IE1 die Ausbildung einer geschlossenen Chromatinstruktur. Dadurch wird die IE-Genexpression aufrechterhalten. Um eine Autorepression der IE-Genexpression durch IE2 zu verhindern, interagieren UL112/113-Genprodukte möglicherweise selektiv mit der crs-Bindedomäne des IE2 und blockieren damit die reprimierende Aktivität des IE2-Proteins.

regulatorische Wirkung auf das analoge IE3 Protein dieses Virus (Tang *et al.*, 2005). UL112/113 Genprodukte können bereits 2h p.i. in der Zelle nachgewiesen werden und bilden die Präreplikationsdomänen aus (Yamamoto *et al.*, 1998; Tang *et al.*, 2005). Es wird postuliert, dass UL112/113 Genprodukte das IE2 Protein sehr effizient binden und damit die Bindung an die crs-Domäne verhindern. Da UL112/113 Genprodukte andere frühe Promotoren synergetisch mit IE2 aktivieren können (Kerry *et al.*, 1996), wird angenommen, dass Komplexe aus IE2 und UL112/113-Genprodukten für die Aktivierung früher Genprodukte verantwortlich sind, während durch diese Komplexierung gleichzeitig die reprimierende Aktivität des IE2 blockiert wird (Abb. 1.3). Wie diese Interaktion zu späteren Zeitpunkten der Infektion wieder gelöst werden kann, um die dann zu beobachtende Repression des MIEP zu ermöglichen ist unklar (Tang & Maul, 2006).

1.1.7. Nicht-kodierende RNAs des HCMV

In den letzten Jahren, konnte eine wachsende Zahl an nicht kodierenden (*noncoding*) RNA-Molekülen (ncRNAs) in vielen verschiedenen Organismen nachgewiesen werden. Diese RNA-Moleküle können durch die RNA-Polymerasen I, II und III synthetisiert werden und die verschiedensten regulativen und enzymatischen Funktionen haben, ohne für ein Protein zu kodieren (Eddy, 2002). Diese ncRNAs können von sehr kleinen Molekülen von ~ 20 nt (*small interfering* RNA [siRNA], *micro* RNA [miRNA], in Eukaryonten) über *small* RNAs von 100 -200 nt (sRNA, in Bakterien), bis zu großen ncRNAs (in *Drosophila* und *Mammalia*) von mehr als 10.000 nt reichen. Diese großen ncRNAs können die Genexpression oder die Chromosomenstabilität beeinflussen und sind am Mechanismus der geschlechtsspezifischen Dosiskompensation des X-Chromosoms beteiligt (Storz, 2002). Eine Klasse von speziellen ncRNAs stellen die siRNAs und miRNAs dar. Sie werden vermutlich nur durch die RNA-Polymerase II gebildet (Lee *et al.*, 2004) und stellen kleine RNA-Moleküle von 22 Nukleotiden (nt) dar, die aus Vorläufermolekülen mit „*Stem-Loop*“-Strukturen gebildet werden (Tang, 2005). Sie spielen im Fadenwurm *C. Elegans* eine wichtige Rolle in der Regulation von Genen der Embryonalentwicklung (Lau *et al.*, 2001). Unter dem Begriff *RNA-interference* (RNAi) werden die regulativen Effekte von miRNAs und siRNAs zusammengefasst (Abb. 1.4), bei denen durch Ribonukleoprotein- (RNP-) Komplexe die Translation oder Stabilität einzelner mRNAs beeinflusst wird. Alle RNA Moleküle mit entsprechenden Elementen in ihrer Sekundärstruktur können als Substrat zur Herstellung von siRNAs und miRNAs dienen, die sowohl *cis* wie auch *trans* wirken können (Meister & Tuschl, 2004; Sontheimer, 2005). Fremde RNA Moleküle, z. B. viralen Ursprungs, die kein Teil dieses

Systems sind, würden hauptsächlich si/miRNAs gegen eigene virale Transkripte bilden, was zum Abbau der viralen RNAs führen würde. Daher wurde vermutet, dass durch dieses System im Sinne von angeborener Immunität auf Zellebene, das Genom vor eindringenden Viren und Transposons geschützt werden kann. Somit könnte RNAi sogar den Zell-Tropismus eines Virus mitbestimmen (Plasterk, 2002).

Große DNA-Viren nutzen das RNAi-System der Zelle und kodieren selbst für virale miRNAs (Cullen, 2007). In verschiedenen Virusfamilien konnten bereits virale miRNAs beobachtet werden (Sarnow *et al.*, 2006), wobei die Mitglieder der *Herpesviridae* die größte Zahl der bisher bekannten viralen miRNAs kodieren (Pfeffer *et al.*, 2005). Das α -Herpesvirus HSV-1 kodiert für RNAs, die während der Latenz exprimiert werden (*latency associated transcripts*, LATs) (Spivack & Fraser, 1988) und stabile Introns darstellen (Wu *et al.*, 1998). Eines dieser Transkripte zeigt eine anti-apoptotische Wirkung (Perng *et al.*, 2000), die durch eine im Transkript kodierte miRNA vermittelt wird. Diese miRNA ist gegen die zellulären pro-apoptotischen Faktoren TGF- β 1 und SMAD3 gerichtet und führt zur Degradation der mRNAs dieser Proteine (Gupta *et al.*, 2006). Auch in den γ -Herpesviren HHV-4 (EBV) und HHV-8 (KSHV) konnten virale miRNAs

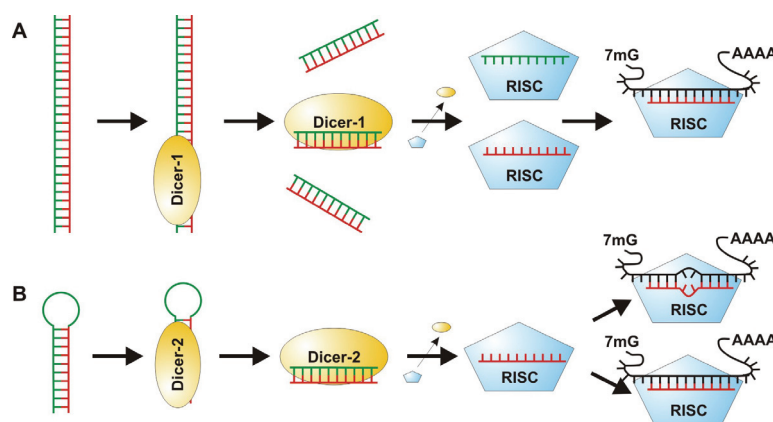


Abb. 1.4:

Schematische Darstellung der Prozessierungswege von siRNA- und miRNA-Molekülen. **A)** Prozessierung von doppelsträngigen RNA-Molekülen zu siRNAs. Doppelsträngige RNA-Moleküle werden durch den Proteinkomplex Dicer-1 erkannt und in kürzere doppelsträngige Fragmente degradiert. Anschließend werden die Einzelstränge getrennt und auf den *RNA-induced silencing complex* (RISC) übertragen, wobei beide Stränge des Vorläufermoleküls weitergegeben werden. Die dadurch aktivierten RISC-Komplexe können nun mit Hilfe des integrierten RNA-Fragments spezifisch jeweils komplementäre RNA Moleküle erkennen und degradieren diese. **B)** Prozessierungsweg von miRNAs. So genannte „*Stem-Loop*“-Sekundärstrukturen in RNA-Molekülen werden durch den Enzymkomplex Drosha (nicht gezeigt) erkannt und durch eine Endonukleaseaktivität aus dem Molekül gelöst. Die freien „*Stem-Loop*“-Strukturen werden dann durch den Dicer-2-Komplex gebunden und weiter prozessiert, wobei nur einer der beiden Stränge spezifisch an den RISC-Komplex weitergegeben wird. Wird nun eine Ziel-mRNA vollständig komplementär gebunden, so wird diese degradiert. Bei einer unvollständigen Bindung an den Zielbereich wird die Translation der mRNA unterbunden, ohne diese abzubauen.

gefunden werden, die sowohl virale als auch zelluläre mRNAs regulieren (Pfeffer *et al.*, 2004; Samols *et al.*, 2005). Im HCMV-Genom wurden bisher 22 Kandidaten für miRNAs gefunden, wobei nur bei 9 dieser Kandidaten eine Expression im Northern Blot bestätigt werden konnte (Dunn *et al.*, 2005; Grey *et al.*, 2005; Pfeffer *et al.*, 2005). Nur für eine dieser miRNA konnte bisher eine Funktion als Immunmodulator nachgewiesen werden (Stern-Ginossar *et al.*, 2007).

1.2. Das IE4-Transkript des HCMV

Frühe molekularbiologische Analysen der HCMV Genexpression hatten vier Transkripte von 1,9 kb, 2,2 kb, 2,3 kb und 5,0 kb im *HindIII*-E Fragment des HCMV Genoms identifiziert, die ohne die Neusynthese viraler Proteine früh in der infizierten Zelle abgelesen wurden. Definitionsgemäß wurden diese Abschnitte als „*immediate early*“ Gene benannt (Jahn *et al.*, 1984). Das größte dieser Transkripte (5 kb RNA) konnte in einer Genomregion lokalisiert werden, der seiner Zeit die Fähigkeit zur Transformation eukaryonter Zellen zugeschrieben wurde (Nelson *et al.*, 1982; Thompson *et al.*, 1994). Aufgrund dieses Befundes wurde der strukturellen und funktionellen Analyse dieser, in der Folge als IE4-Gen bezeichneten Region große Bedeutung beigemessen. Die IE4-RNA konnte zu allen Phasen des viralen Replikationszyklus in der infizierten Zelle nachgewiesen werden und zeigte somit eine für IE-Transkripte ungewöhnliche Expressionskinetik (Jahn *et al.*, 1984). Sie konnte mit Hilfe von Adsorption an Oligo-dT Säulen sowohl in PolyA⁺- als auch in PolyA⁻-Fraktionen nachgewiesen werden. In weiteren Analysen war es möglich die 5'- und 3'-Grenzen des IE4-Transkripts zu bestimmen. Die Sequenzierung des IE4-Bereichs ergab, dass die Nukleotidsequenz mit

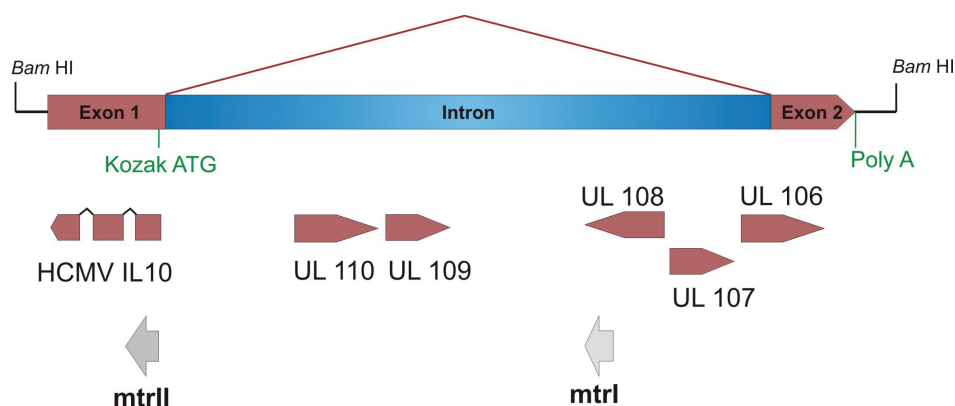


Abb. 1.5:

Schematische Darstellung des IE4-Bereichs (Jahn *et al.*, 1984) mit den putativen ORFs UL106 – UL110, den transformierenden Regionen (*morphological transforming regions* [mtr I (Nelson *et al.*, 1984) und mtr II (Thompson *et al.*, 1994)]) und dem von Rawlinson und Barrell (1993) beschriebenen Spleiß-Vorgang in der IE4-Region.

Stop-Kodons durchsetzt war. Demzufolge konnten nur sehr kleine offene Leserahmen identifiziert werden (Nelson *et al.*, 1984; Plachter *et al.*, 1988). Rawlinson und Barrell konnten in der Folge mit Hilfe von cDNA-Klonierung eine gespleißte RNA von 1,1 kb identifizieren. Deren primäres Transkript überspannte den gesamten IE4-Bereich und bestand aus zwei Exons, die ein Intron von 4,5 kb flankieren (Abb. 1.5). Die gespleißte 1,1 kb RNA kodierte für einen putativen offenen Leserahmen von nur 31 Aminosäuren. Der Transkriptionsstart dieser RNA wurde etwa 800 bp 5' zum Spleiß-Donor kartiert (Rawlinson & Barrell, 1993). Dieser Spleiß-Donor fiel mit der von Plachter und Kollegen (1988) identifizierten 5'-Grenze des IE4-Transkripts zusammen. Die zu Beginn dieser Arbeit verfügbaren Erkenntnisse zur Struktur der 5 kb RNA führten zu der Hypothese, dass es sich bei dieser RNA um ein ungewöhnlich stabiles Intron handeln könnte. Während der Durchführung dieser Arbeit wurden Daten veröffentlicht, die eine Intronstruktur der 5 kb RNA bestätigten (Kulesza & Shenk, 2004).

1.3. Gegenstand der Arbeit

Die Genexpression des HCMV ist streng reguliert und folgt einer strikten Aktivierungskaskade. Die Expression der IE-Genprodukte ist für die Aktivierung aller nachgeschalteten viralen Gene essentiell und steuert somit die erfolgreiche permissive Replikation des HCMV. Für HCMV sind vier Bereiche bekannt, die IE-Transkripte kodieren. Einer dieser Genomabschnitte kodiert neben den viralen Transaktivatoren IE1 und IE2 für eine 5,0 kb RNA (IE4-Transkript) (Jahn *et al.*, 1984), deren Bedeutung für die Virusvermehrung bislang unklar blieb. Diese RNA wird im Gegensatz zu anderen IE-RNAs während des ganzen Replikationszyklus exprimiert (Plachter *et al.*, 1988). Ein Genprodukt dieser RNA konnte bislang noch nicht identifiziert werden. Bisher gab es außer der Beobachtung von transformierenden Effekten in transfizierten Mausfibroblasten (Nelson *et al.*, 1982; Thompson *et al.*, 1994) und der Konservierung einiger ORFs in diesem Bereich in klinischen Isolaten (Murphy *et al.*, 2003b) keine Hinweise auf eine biologische Funktion. Die Arbeiten von Rawlinson und Kollegen (1993) und Kulesza und Shenk (2004) zeigten die Möglichkeit auf, dass es sich bei der 5,0 kb RNA nicht um eine kodierende mRNA, sondern um ein stabiles Intron des primären IE4-Transkripts handeln könnte. Die Entdeckung eines biologisch aktiven stabilen Introns in HSV-1 (Wu *et al.*, 1998; Perng *et al.*, 2000) und die Entdeckung nicht kodierender regulatorischer RNAs in viralen Systemen (Pfeffer *et al.*, 2004; Sarnow *et al.*, 2006) warfen die Frage auf, ob es sich bei dem IE4-Transkript, um eine biologisch aktive nicht-kodierende RNA handelte. Ziel dieser Arbeit war es daher, durch die Analyse des IE4-

Bereichs ein mögliches Genprodukt zu finden und mit Hilfe viraler Deletionsmutanten Hinweise auf eine Bedeutung des IE4-Transkripts für die virale Genexpression und Replikation zu erhalten.

2. Material und Methoden

2.1. Allgemeine Laborgeräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Analysenwaage	BP61	Sartorius, Saarbrücken
Brutschrank	B12	Heraeus, Hanau
CO ₂ Inkubator	Steri-Cult 200 incubator	Forma Scientific, Egelsbach
Digitalkamera	Power Shot G5	Canon Deutschland, Krefeld
Durchflusszytometer	FACSort	Becton Dickinson, Heidelberg
Elektroblot-Apparatur	Trocken-Blotter	Hölzel, Wörth/Hörlikofen
Elektroporations-Apparatur	Gene Pulser II	Bio-Rad, München
Fluoreszenzmikroskope	Axiophot DM IRB	Zeiss, Jena Leitz, Wetzlar
Gelapparaturen	horizontale Gelelektrophorese vertikale Gelelektrophorese	Keutz, Reiskirchen Hoefler/Pharmacia BioTech, Freiburg
Heizblock	Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Heizrührer	RCT BASIC	IKA-Labortechnik, Staufen
Laborwaage	LP5200P	Sartorius, Göttingen
Luminometer	LB 9507	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Mikroskop	Axiovert 25	Zeiss, Jena
Netzgeräte	Electrophoresis Power Supply 600	Pharmacia Biotech, Freiburg
PCR Arbeitsplatz	Captair bio	Erlab, Köln
PCR-Cycler	Tpersonal	Biometra, Göttingen
pH-Meter	CG 842	Schott, Mainz
Photometer	Ultraspec III Bio Photometer	Biometra, Göttingen Eppendorf, Hamburg
Pipette, programmierbar	50-1000 µl, Research Pro	Eppendorf, Hamburg
Pipetten, verstellbar	2, 20, 200, 1000 µl	Gilson, Langenfeld

Pipettierhilfen	Pipetboy acu	Integra Biosciences, Fernwald
Real-Time PCR Cycler	ABIPrism 7500 Real Time PCR System ABIPrism 7700 Sequence Detector	Applied Biosystems, Weiterstadt
Schüttelinkubator	Cellstar	Nunc, Wiesbaden
Schüttelwasserbad	OLS 200	Grant, Camebridge (GB)
Schüttler	HS 501 digital	IKA-Labortechnik, Staufen
Sterilbank	HeraSafe	Heraeus, Hanau
Vortex	MS1 Minishaker	IKA-Labortechnik, Staufen
Wasserbad mit Thermostat		Memmert, Schwabach
Zentrifugen	Tischzentrifuge 5417 C Kühlzentrifuge 5417 R Megafuge 2.0, kühlbar RC5CPlus (Rotoren SLA1500, SS34)	Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg Heraeus, Hanau Sorval, Hanau

2.2. Chemikalien

Soweit nicht anderweitig angegeben, wurden alle verwendeten Chemikalien von Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen. Zum Ansetzen von Lösungen wurde autoklaviertes bi-distilliertes Wasser verwendet.

2.3. Bakterien und ihre Kultivierung

2.3.1. Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	T _{opt.}	Literatur
<i>E.coli</i> DH10B	F ⁻ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) φ 80 <i>dlacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)</i> 7649 <i>galU galK rspL nupG</i>	37°C	(Grant <i>et al.</i> , 1990)
<i>E.coli</i> EL250	DH10B [<i>λ</i> cl857 (<i>cro-bioA</i>) < > <i>araC-P_{BAD}flpe</i>] ^b	32°C	(Lee <i>et al.</i> , 2001)
<i>E.coli</i> DH5α	<i>supE44 ΔlacU169 (Φ80 lacZ</i> ΔM15) <i>hsdR17 recA1</i> <i>endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	37°C	Invitrogen, Karlsruhe

2.3.2. Medien und Medienzusätze

Medien

Lysogeny Broth (LB) – Medium

10 g Trypton; 5 g Hefe-Extrakt; 5 g NaCl in 1 l H₂O_{dest} lösen, mit NaOH den pH-Wert auf 7,5 einstellen und autoklavieren (Bertani, 1951).

LB-Agarplatten

1,5% (w/v) Agar-Agar wurde durch Aufkochen in LB-Medium gelöst und autoklaviert. Zum Gießen wurde der autoklavierte LB-Agar geschmolzen, in einem Wasserbad auf 60°C abgekühlt. Der Zusatz von Antibiotika zur Selektion resistenter Bakterienklone erfolgte in den unten angegebenen Konzentrationen.

Einfriermedium

LB-Medium + 30% (v/v) Glycerin (autoklaviert)

Medienzusätze

Kanamycin	Stock 10 mg/ml in H ₂ O, sterilfiltriert, Endkonzentration 15 µg/ml
Ampicillin	Stock 75 mg/ml in H ₂ O, sterilfiltriert, Endkonzentration 75 µg/ml
Chloramphenicol	Stock 34 mg/ml in Ethanol p.a. sterilfiltriert, Endkonzentration 15 µg/ml
L(+) Arabinose	Stock 10% in H ₂ O, Endkonzentration 0,1%

2.3.3. Kultivierung

Flüssigkulturen

LB-Medien wurden zunächst mit den entsprechenden Antibiotika versetzt, mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C (32°C für EL250 Kulturen) mit 200 Upm unter Schütteln inkubiert.

Kultivierung auf Agarplatten

Es wurden Verdünnungsreihen der zu kultivierenden Bakterien in LB-Medium hergestellt und anschließend mit einem Drigalski-Spatel (mit 96% EtOH abflammen) auf Agarplatten ausgestrichen bis die Flüssigkeit eingezogen war. Die Platten wurden nachfolgend über Nacht bei 37°C (32°C für EL250 Kulturen) inkubiert.

Für Verdünnungsausstriche wurden Einzelkolonien mit einer Platinimpföse gepickt und in flachem Winkel in einigen Strichen auf die Agarplatte ausgebracht. Dann wurde die Impföse erneut ausgeglüht, im Agar gekühlt und vom Endpunkt des ersten Ausstrichs beginnend erneut ausgestrichen.

2.3.4. Kryokonservierung

Aus einer Bakterienkultur wurde kurz vor der stationären Wachstumsphase ein Aliquot entnommen, mit 30% Glycerin versetzt und bei -80°C eingefroren.

2.3.5. Transformation

Zur Transformation von *E.coli* Zellen wurde die Methode der Elektroporation verwendet. Dabei handelt es sich um ein effizientes und schnelles Verfahren Plasmide und lineare DNA in Bakterienzellen einzuschleusen (Calvin & Hanawalt, 1988).

Herstellung elektrokompetenter *E.coli*

In einem Erlenmeyerkolben wurden 200 ml LB-Medium mit 2 ml einer ÜN-Kultur der entsprechenden Bakterien angeimpft, bei 37°C bis zu einer OD_{600} von 0,5-0,6 unter Schütteln kultiviert und dann für 15 min auf Eis inkubiert. Alle nachfolgenden Schritte wurden unter Kühlung auf Eis durchgeführt. Die Bakteriensuspension wurde zentrifugiert (6000 Upm, 10 min, 4°C , RC5CPlus Zentrifuge mit Rotor SLA1500) und das resultierende Pellet einmal in eiskaltem sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ (14.000 Upm, 5 min, Rotor SS34) und zweimal in eiskaltem 10%igem Glycerin gewaschen. Das Pellet wurde in 5 ml eiskaltem 10%igen Glycerin aufgenommen und diese Bakteriensuspension dann in 50 μl Aliquots aufgeteilt, die sofort in flüssigem Stickstoff tiefstgefroren und anschließend bei -80°C gelagert wurden.

Herstellung elektrokompetenter *E.coli* EL250 für die BAC-Mutagenese

Mit 2 ml einer ÜN-Kultur des *E.coli* Stammes EL250 wurden 200 ml LB-Medium angeimpft und bei 32°C bis zu einer OD_{600} von 0,5-0,6 unter Schütteln inkubiert. 10 ml Bakterienkultur wurden in einem Erlenmeyerkolben für 20 min bei 42°C induziert und anschließend in Eiswasser rasch abgekühlt. Die Bakteriensuspension wurde dann für 10 – 40 min auf Eis inkubiert und ab diesem Schritt konstant gekühlt. Die Bakteriensuspension wurde pelletiert (4500 Upm, 10 min, 4°C in einer Megafuge 2.0) und einmal in eiskaltem sterilem H_2O und zweimal in eiskaltem 10%igen Glycerin

gewaschen (14.000 Upm, 30 sec, 4°C). Das Pellet wurde in 100 µl eiskaltem 10%igem Glycerin aufgenommen und in 50 µl Aliquots aufgeteilt. Diese wurden dann in flüssigem Stickstoff tiefstgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

Elektroporation

Ein 50 µl Aliquot elektrokompetenter *E.coli* Zellen wurde mit der entsprechenden DNA-Menge vermischt (max. 2µl Volumen) und in eine vorgekühlte Kuvette (BioRad, Elektrodenabstand 0,2 cm) überführt. Die Bakterien wurden dann im Gene Pulser II mit einer Spannung von 2,1 kV, einem Widerstand von 200 Ω und einer Kapazität von 25 µF elektroporiert. Die Bakterienzellen wurden sofort in vorgewärmtes LB-Medium überführt und 1-2 h bei der erforderlichen Inkubationstemperatur zur Regeneration geschüttelt. Anschließend wurde die Bakteriensuspension in geeigneten Verdünnungen auf Agarplatten mit Selektionsantibiotikum ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank inkubiert.

2.4. Säugerzellen und ihre Kultivierung

2.4.1. Kultivierung

Alle Arbeiten wurden an einer Sterilbank mit sterilen Glas und Plastikwaren durchgeführt. Die Kultivierung aller Zellen fand bei 37°C, 5% CO₂ und 95%iger Luftfeuchtigkeit in einem CO₂-Inkubator statt. Als Zellkulturgefäße wurden 25, 75 und 175 cm² Zellkulturflaschen, bzw. 6-, 24-, 96-Well Platten und 10 cm Zellkulturschalen der Firma BD Falcon (Heidelberg) verwendet. Sollten Zellen ausgesät oder zur weiteren Kultivierung die Zelldicht reduziert werden, wurden die Zellen mit einer Trypsinbehandlung (5 min, 37°C, in Trypsin/EDTA) vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst und mit Medium versetzt. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Zellen nach der Trypsinbehandlung durch Zentrifugation in einer Megafuge 2.0 für 4 min bei 1500 Upm und RT pelletiert und anschließend die gewünschte Zellzahl in frischem Medium in einem geeigneten Kulturgefäß wieder ausgesät.

Alle Zellkulturen wurden in regelmäßigen Abständen mit Hilfe des „Mykoplasma Detection Kit“ der Fa. Roche (Mannheim) auf Mykoplasmenkontaminationen getestet. Bei positivem Testergebnis wurden die befallenen Zellen mit der Antibiotika-Kombination BM-Cyclin (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben behandelt.

Puffer und Lösungen

Dulbecco's PBS (Invitrogen, Karlsruhe)

(Phosphate buffered saline)

136 mM NaCl, 26 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄

Trypan-Blau

0,4% in 85% Kochsalzlösung → 1:4-Verdünnung in PBS (Endkonzentration: 0,1%)

Trypsin/EDTA (PAA, Cölbe)

0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA

Medien und Medienzusätze

Bezugsquelle für alle Zellkulturmedien und Medienzusätze war, wenn nicht anders angegeben, die Firma PAA (Cölbe). Das verwendete fötale Kälberserum (FKS) wurde von der Firma Biochrom (Berlin) bezogen. Sämtliche verwendeten Kulturmedien enthielten den Farbstoff Phenolrot als pH-Indikator.

MEM 5% FKS

Minimal essential medium mit 5% FKS, 2 mM L-Glutamin, 50 mg/l Gentamycin und 0,5 ng/ml bFGF (*basic fibroblast growth factor* von Invitrogen, Karlsruhe).

DMEM 10% FKS

Dulbecco's modified eagle medium mit 10% FKS, 2 mM L-Glutamin und 50 mg/l Gentamycin.

Einfriermedium

10% Dimethylsulfoxid (DMSO von Roth, Karlsruhe) in FKS.

Antibiotika

Antibiotikum	Wirtsspektrum	Stammlösung	Endkonzentration
BM Cyclin Lsg. 1	Bakterien	2,5 mg/ml	10 µg/ml
BM Cyclin Lsg. 2 (Roche, Mannheim)	(Mycoplasmen)	1,25 mg/ml	5 µg/ml
Geneticin (G418) (PAA, Cölbe)	Pro- und Eukaryonten	50 mg/ml	280 bis 600 µg/ml

Hygromycin B (Roche, Mannheim)	Pro- und Eukaryonten	50 mg/ml	10 µg/ml
Gentamycin (PAA, Cölbe)	Bakterien	50 mg/ml	50 µg/ml

2.4.2. Verwendete Zellen und Zelllinien

293T (ATCC: CRL-11268)

Bei der Zelllinie 293T handelt es sich um semi-adhärenente Epithelzellen aus der menschlichen Niere, die sich mit hoher Effizienz mit DNA transfizieren lassen. Die Zellen exprimieren das große T-Antigen des „*Simian Virus (SV-) 40*“. Plasmide, die den „*origin of replication*“ des SV-40 kodieren, werden in 293T Zellen aufgrund der Expression des T-Antigens amplifiziert. Dadurch wird eine Verstärkung der transienten Expressionsrate heterologer, plasmidkodierter Proteine erreicht. Diese Zelllinie wurde in DMEM 10% FKS kultiviert.

Psf5

Kulturen primärer humaner Vorhautfibroblasten (*human foreskin fibroblasts*, HFF) wurden aus Vorhäuten angelegt, die im Rahmen von planmäßigen Zirkumzisionen von Kleinkindern oder Neugeborenen gewonnen wurden.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Fibroblasten stammten alle aus bereits länger zurückliegenden Isolationen. Diese Zellen wurden in MEM 5% FKS kultiviert.

U373-MIEP, U373-UL112/113, U373-UL97

Hierbei handelt es sich um stabil transfizierte Zelllinien, die aus U373-MG Zellen (ECACC: 89081403) durch Transfektion hergestellt wurden. Diese Zelllinien tragen in ihrem Genom das Luciferase Reporter-Gen unter Kontrolle der HCMV Promotoren MIE-, UL-97 oder UL112/113 (Hiller, 1996; Pepperl, 2000). Diese Zellen wurden in DMEM 10% FKS kultiviert.

2.4.3. Zellzahlbestimmung und Vitalitätstest

Der anionische Lebendfarbstoff Trypanblau wird standardmäßig zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen verwendet. Dabei wird der Farbstoff von lebenden Zellen ausgeschlossen, während er in tote Zellen ungehindert eindringen kann. Dort bindet er an zelluläre Proteine, was zu einer intensiven Blaufärbung toter Zellen führt.

Zur Zellzahlbestimmung wurde die zu untersuchende Zellsuspension mit Trypanblaulösung im Verhältnis 1:1 versetzt und anschließend auf eine Neubauerzählkammer aufgebracht. Unter einem Mikroskop wurden die lebenden Zellen innerhalb der eingearbeiteten Gitterlinien gezählt (Großquadrate). Die Zellzahl wurde dann nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = \left(\frac{N}{n} \right) \times V \times 10^4$$

N = Anzahl gezählter Zellen

n = Anzahl gezählter Großquadrate

V = Verdünnungsfaktor

10^4 = Kammerfaktor

2.4.4. Kryokonservierung

Um Zellen für längere Zeit zu konservieren, wurden diese in Einfriermedium bei -80°C bzw. in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Dazu wurden $1-5 \times 10^6$ Zellen in 1,5 ml Einfriermedium aufgenommen und in Einfrierampullen (Nunc, Wiesbaden) überführt. Anschließend wurden die Zellen in einem mit Isopropanol gefüllten Einfriergefäß langsam über Nacht abgekühlt. Durch diese Prozedur und den Zusatz von DMSO im Einfriermedium soll die Bildung von Eiskristallen in den Zellen minimiert werden.

Zur erneuten Kultivierung der Zellen wurden diese schnell in einem 37°C Wasserbad aufgetaut, mit angewärmtem Medium gewaschen und anschließend in frischem Medium in Zellkulturflaschen ausgesät.

2.4.5. Transfektion

Chemische Transfektion

Superfect™ (Qiagen, Hilden)

Die wirksamen Bestandteile in Superfect™ stellen aktivierte Dendrimere dar. Bei diesen Makromolekülen handelt es sich um komplexe baumartig verzweigte Strukturen aus Polyamidoaminpolymeren. Diese Strukturen bilden Komplexe mit Nukleinsäuren und binden an negativ geladene Oberflächenmoleküle (z. B. Glykoproteine) der Zielzelle. Der Komplex wird vermutlich über Phagozytose in die Zellen aufgenommen, wobei diese Methode sich im Allgemeinen durch eine hohe Transfektionseffizienz und eine geringe

Zytotoxizität auszeichnet. Die Transfektion wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden die Zellen am Vortag subkonfluent ausgesät (40 – 80% Konfluenz). Die gewünschte DNA Menge wurde mit Zellkulturmedium ohne Zusätze und Superfect™ vermischt und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Superfect™-DNA Komplex direkt auf die zuvor mit 1x PBS gewaschenen Zellen getropft und gleichmäßig verteilt. Nach einer Inkubation von 2-3 h und anschließendem Mediumwechsel wurden die Zellen für weitere 48 h kultiviert und danach für weiterführende Experimente verwendet.

Lipidtransfektion

Perfectin™

Dieses Transfektionsreagenz ist ein Vertreter der Lipofektionsreagenzien und besteht aus dem neutralen Lipid Dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) und einem kationischen Konjugat dieses Lipids, die einen Komplex mit der Nukleinsäure bilden. Der molekulare Mechanismus der Lipidtransfektion ist noch immer unbekannt. Die Transfektion wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden Zellen am Vortag ausgesät, so dass die Kulturen zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von 50-70% erreichten. Die zu transfizierende DNA-Menge wurde mit DNA-Diluent gemischt, nach einer 5 minütigen Inkubation bei RT mit Perfectin™ und serumfreiem Medium versetzt und weitere 30 min bei RT inkubiert. Zwischenzeitlich wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und eine der Zellkulturgefäßgröße entsprechende Menge frisches Medium vorgelegt. Das Perfectin™-DNA Gemisch wurde dann auf die Zellen getropft. Nach 24 h wurden die Zellen mit frischem Medium versorgt und anschließend abhängig von dem durchzuführenden Experiment zwischen 24 und 72 h weiter kultiviert.

Physikalische Transfektion

Magnetische Nanobeads (MATra™, IBA GmbH, Göttingen)

Eine relativ neue Methode der Transfektion stellt die Verwendung supramagnetischer Nanokügelchen dar. Diese Partikel aus Eisenoxid tragen eine Polymerbeschichtung und durch eine positive Oberflächenladung können diese Partikel negativ geladene Nukleinsäuren binden. Die beladenen Kügelchen werden anschließend mit Hilfe eines Magnetfeldes in Richtung der Zellen beschleunigt und dann über Phago- oder Pinozytose in die Zellen aufgenommen. Die Transfektion wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Am Vortag wurden Zellen subkonfluent ausgesät, so dass die

Kulturen zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von 60-80% erreichten. Die zu transfizierende DNA-Menge wurde mit der entsprechenden Menge an MATra™ in Zellkulturmedium ohne Zusätze vermischt. Nach einer 20 minütigen Inkubation bei RT wurden die dabei gebildeten Komplexe auf die Zellen getropft. Die Zellen wurden anschließend für 20 min im CO₂-Inkubator auf einer Magnetplatte platziert. Nach einem Mediumwechsel wurden die Zellen noch mindestens 48 h unter geeigneten Bedingungen kultiviert und anschließend für Experimente verwendet.

2.4.6. Apoptosemessung

Um den Anteil an apoptotischen Zellen in einer Zellsuspension zu bestimmen, wurde eine Nicoletti-Färbung (Nicoletti *et al.*, 1991) durchgeführt und die gefärbten Zellen anschließend in einem Durchflußzytometer (Fluorescence Activated cell sorting = FACS) analysiert. Dazu wurden Zellen in 6-Well Zellkulturplatten subkonfluent ausgesät und über Nacht kultiviert. Je nach durchzuführendem Experiment wurden die Zellen mit verschiedenen Infektionsstärken (*multiplicity of infection*, MOI) infiziert und 24 h nach der Infektion für die Apoptosemessung verwendet.

Induktion

Um zu bestimmen, welchen Einfluss eine Infektion der Zielzellen mit verschiedenen HCMV-Mutanten auf die Induktion extrinsischer Apoptose hat, wurde getestet, inwiefern sich Apoptose in infizierten HFF durch die Aktivierung des Fas(CD95)-Rezeptors noch induzieren ließ. Zur Induktion von Fas-Rezeptor-vermittelter Apoptose wurden die Zielzellen 24 h nach Infektion mit Anti-Fas(CD95)-Antikörper (400 ng/ml) für 16 h im CO₂-Inkubator kultiviert. Um in allen Proben die *de-novo* Synthese von anti-apoptotischen Proteinen während dieser 16 stündigen Inkubation zu verhindern, wurden die Zellen parallel zur Induktion mit Cycloheximid (CHX, 5 µg/ml) behandelt. Zur Messung intrinsischer Apoptose wurden infizierte Zellen 24 h p.i. für 16 h mit CHX (5µg/ml) behandelt, anschließend fixiert und für die Nicoletti-Färbung verwendet.

Nicolettifärbung

Für die Färbung wurden die Zellkulturüberstände und die durch Trypsinbehandlung abgelösten Zellen in FACS-Röhrchen (BD Falcon, Heidelberg) gesammelt und mit PBS gewaschen (Zentrifugation in einer Heraeus Megafuge 2.0 mit 1500 Upm für 5 min). Nach dem Waschen wurden die Zellen in 70%igem Ethanol fixiert (-20°C für mind.

30 min). Nach der Fixierung wurden die Zellen nochmals in PBS gewaschen und anschließend Propidiumiodid (50 µg/ml in PBS, AppliChem, Darmstadt) über Nacht bei 4°C gefärbt. Dabei bindet Propidiumiodid direkt und proportional an die DNA der Zellen. Nach der Fixierung sind die Membranen der Zellen sowohl für Propidiumiodid wie auch für kleine DNA-Fragmente durchlässig. Da apoptotische Zellen ein fragmentiertes Genom aufweisen, diffundieren aus apoptotischen Zellen kleine Fragmente der DNA heraus. Diese Zellen weisen also einen geringeren DNA-Gehalt auf als nicht-apoptotische Zellen und können so im FACS quantifiziert werden

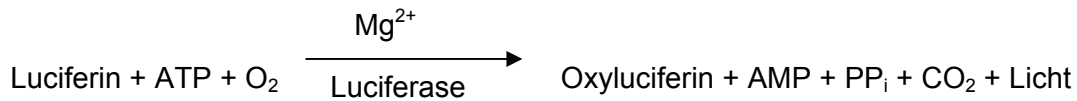
FACS-Messung

Die FACS-Messung erlaubt es, das Vorhandensein bestimmter Zelltypen und Biomoleküle in Zellpopulationen mit Hilfe fluoreszierender Farbstoffe direkt oder über Antikörper zu quantifizieren. Die zu untersuchende Zellpopulation wird mit Hilfe der hydrodynamischen Fokussierung so aufgetrennt, dass es möglich ist, einzelne Zellen an einem Fluoreszenzdetektor vorbeizuführen. Die Streuung des emittierten Lichts lässt Rückschlüsse über die Granularität des Zytoplasmas, die Größe des Zellkerns und die Größe der Zellen zu. Zur Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen in der infizierten HFF-Population wurde diese nach der Durchführung der Nicolettifärbung mittels FACS-Analyse untersucht und die Menge an gebundenem Propidiumiodid bestimmt (Emissionsmaximum: 612 nm). Nicht-apoptotische HFF-Zellen zeigen ein charakteristisches Signalmuster mit zwei deutlichen Signal-Maxima. Diese beiden Signalspitzen repräsentieren Zellen in den verschiedenen Phasen der Zellteilung. Die erste Spitze mit geringerer Fluoreszenz entspricht Zellen in der G₁-Interphase des Zellzyklus, die zweite Spitze Zellen in den S-, G₂- und M-Phasen. Da apoptotische Zellen aufgrund ihres fragmentierten Genoms geringere DNA-Mengen als nicht-apoptotische Zellen enthalten, wurde im FACS der prozentuale Anteil an Zellen bestimmt, deren Fluoreszenz geringer als die des G₁-Maximums war.

2.4.7. Messung der Luciferase-Aktivität

Zur Analyse der Aktivierung von HCMV-Promotoren wurden die stabil transfizierten Zelllinien U373-MIEP, U373-UL97 und U373-UL112/113 (Hiller, 1996) eingesetzt, die das Enzym Luciferase von *photinus pyralis* unter der Kontrolle der entsprechenden HCMV-Promotoren exprimieren. Zur Messung der Luciferase-Aktivität dieser Zellen wurde der „Luciferase Reporter Gene Assay, high sensitivity“ Kit (Roche, Mannheim) verwendet. Dabei setzt das Enzym Luciferase sein Substrat Luciferin unter Verbrauch

von Adenosintriphosphat und Sauerstoff um. Das dadurch freigesetzte Licht kann in einem Luminometer detektiert werden und ist im Sättigungsbereich der Reaktion direkt proportional zur vorhandenen Enzymmenge.



Die infizierten Zellen wurden 24 h nach Infektion mittels 350 µl 1x Lysepuffer entweder direkt im Well (6-Well Format) oder nach einer Trypsinbehandlung (Zellkulturflaschen) in einem 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß für 15 min bei RT lysiert. Das Lysat wurde durch mehrfaches Pipettieren homogenisiert und 300 µl dieses Lysats in ein frisches Gefäß überführt. Durch Zentrifugation wurden noch vorhandene Zelltrümmer pelletiert (Tischzentrifuge, 14.000 Upm, 1 min). Anschließend wurden 50 µl Lysat mit 50 µl Luciferase-Substrat (Luciferin) in einem Messröhrchen vermischt und innerhalb von 10 sec nach Zugabe des Substrats im Luminometer (LB 9507) für 5 s gemessen. Alle Proben wurden in drei abhängigen Replikaten gemessen, deren Mittelwert durch die Betriebssoftware des Luminometers ausgegeben wurde.

2.5. Viren und ihre Kultivierung

2.5.1. Verwendete Virusstämme

Ad169 (NCBI Accession number: X17403)

Dieser Virusstamm wurde 1956 von Rowe isoliert (Rowe *et al.*, 1956) und stellt seither einen der am häufigsten verwendeten HCMV Laborstämme dar. Die Nukleinsäuresequenz dieses Stammes konnte vollständig aufgeklärt werden (Chee *et al.*, 1990).

TB40_E

Hierbei handelt es sich um ein klinisches Isolat, das im Gegensatz zu Laborstämmen noch die Fähigkeit besitzt Endothelzellen lytisch zu infizieren (Sinzger *et al.*, 1999). Wie alle bislang untersuchten klinischen Isolate besitzt TB40_E im Vergleich zu Ad169 zusätzliche offene Leserahmen. Es wird vermutet, dass diese Leserahmen Pathogenitätsfaktoren für die *in-vivo* Infektion kodieren, die für die Vermehrung in Zellkultur verzichtbar sind und somit bei Passage in HFF-Kulturen verloren gehen (Cha *et al.*, 1996).

RV-HB5

Dieses Virus wurde durch Rekonstitution aus dem BACmid pHB5 (Borst *et al.*, 1999) gewonnen. Das pHB5 BACmid wurde durch Insertion des BAC-Vektors in das Virus Ad169 konstruiert, wobei die Gene US2-US6 deletiert wurden. Das pHB5 BACmid diente als Basis für alle in dieser Arbeit durch BAC-Mutagenese hergestellten Virusmutanten.

Die im Folgenden beschriebenen Virusmutanten wurden von Sandra Pepperl-Klindworth hergestellt und charakterisiert (Pepperl, 2000; Pepperl-Klindworth *et al.*, 2006):

RVAdIE4-1 #7

Diesem HCMV Stamm fehlt der genomische Bereich von Nukleotid 155.909 - 159.819. Dieser Bereich ist gegen eine Neomycinresistenz(NeoR)-Kassette ausgetauscht. Durch die genetische Manipulation wurden der kodierende Bereich für das so genannte IE4-Transkript und Teile des durch den Leserahmen UL111a kodierten HCMV-IL10 (Kotenko *et al.*, 2000) entfernt.

RVAdIE4-2 #129

Im Genom dieser Mutante wurde der zentrale Abschnitt des Introns der im IE4-Bereich kodierten RNA gegen eine NeoR-GFP-Kassette ausgetauscht. Die Deletion erstreckt sich von Nukleotid 155.909 – 159.328. Im Gegensatz zur zuvor beschriebenen Mutante RVAdIE4-1 #7 ist der Leserahmen des HCMV IL10 Homologs in diesem Virus nicht durch die Deletion beeinträchtigt.

RVAdIL10C

In dieser Virusmutante wurde der zentrale Bereich des in UL111a kodierten viralen IL10 Homologs deletiert. Der Bereich von Bp 159.824 – 160.353 wurde durch eine GFP-NeoR-Kassette ersetzt.

RVTBIE4 #29

In dieser, auf TB40_E basierenden Mutante, wurde der gleiche Bereich wie in RVAdIE4-2 #129 deletiert und gegen eine NeoR-Kassette ausgetauscht.

RVTBIL10C

In dieser auf TB40_E beruhenden Mutante wurde der gleiche Bereich wie in RVAdIL10C deletiert. Sie enthält in diesem Bereich des viralen IL10 Homologs UL111a eine NeoR-Kassette.

Die im Folgenden beschriebenen Mutanten wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt und charakterisiert (für ausführlichere Beschreibungen siehe Kap. 3.3):

RV-KK-1

Diese Mutante wurde aus dem BACmid „pBAC-KK-1“ rekonstituiert und entspricht der Mutante RVAdIE4-2 #129. Der dem IE4-Intron entsprechende genomische Abschnitt wurde durch eine AmpR-Kassette mittels BAC-Mutagenese ersetzt.

RV-KK-2

Dieses Virus wurde aus dem BACmid „pBAC-KK-2“ durch Rekonstitution gewonnen und stellt die Revertante des RVKK-1 Virus dar. Diese Revertante enthält innerhalb der IE4-Intron Sequenz noch ein FRT-Motiv von 30 Bp Länge.

RV-KK-3

Infektiöse Überstände dieser Mutante wurden durch Rekonstitution aus dem BACmid „pBAC-RVKK-3“ gewonnen. Zur Herstellung dieser Virusmutante wurde der Spleiß-Donor der IE4 RNA durch eine AmpR-Kassette, die von FRT-Motiven flankiert wurde, unterbrochen.

RV-3 FLP

Infektiöse Überstände dieser Mutante wurden durch Rekonstitution aus dem BACmid „pBAC-KK-3 FLP“ gewonnen. Zur Herstellung dieser Virusmutante wurde der Spleiß-Donor der IE4 RNA durch eine AmpR-Kassette, die von FRT-Motiven flankiert wurde, unterbrochen. Diese Kassette wurde anschließend durch Rekombination mittels FLP-Rekombinase entfernt, was zu einer Reduktion der eingeführten Fremdsequenz im endgültigen BACmid führte (noch ein FRT-Motiv von 30 Bp).

RV-KK-4

Infektiöse Überstände dieser Mutante wurden durch Rekonstitution aus dem BACmid „pBAC-KK-4“ gewonnen. Zu ihrer Herstellung wurde in dieser Virusmutante die vollständige Intronsequenz zwischen Spleiß-Donor und Spleiß -Akzeptor der IE4 RNA durch eine AmpR-Kassette, die von FRT-Motiven flankiert wurde, ersetzt. Die Sequenzen des Spleiß-Donors und -Akzeptors blieben davon unberührt.

RV-4 FLP

Infektiöse Überstände dieser Mutante wurden durch Rekonstitution aus dem BACmid „pBAC-KK-4 FLP“ gewonnen. Zu ihrer Herstellung wurde in dieser Virusmutante die vollständige Intronsequenz zwischen Spleiß-Donor und Spleiß-Akzeptor der IE4 RNA durch eine AmpR-Kassette, die von FRT-Motiven flankiert wurde, ersetzt. Anschließend wurde diese Kassette durch Induktion der FLP-Rekombinase entfernt, so dass nur 30 Bp Fremdsequenz (FRT-Motiv) im endgültigen BACmid zurückblieben.

RV-KK-5

Infektiöse Überstände dieser Mutante wurden durch Rekonstitution des BACmids „pBAC-KK-5“ gewonnen. In dieser Virusmutante wurde ein Teil des ORFs UL111a (HCMV IL10 Homolog) durch eine AmpR-Kassette ersetzt. Um dabei alle eventuell verwendeten alternativen Startcodons zu entfernen, wurde der gesamte Bereich vom ersten Startcodon bis zum letzten alternativen Startcodon (GTG, in Exon 3) entfernt.

2.5.2. Rekonstitution aus BACmiden

Um die in dieser Arbeit hergestellten BACmide zu rekonstituieren und infektiöse Überstände der daraus resultierenden Viren zu gewinnen, wurden HFF mit den BACmiden transfiziert und anschließend bis zur Bildung von Plaques passagiert.

Dazu wurde BACmid DNA über den „High Purity Plasmid Purification Kit“ (Marligen Bioscience, Vertrieben von BioCat, Heidelberg) nach den Angaben des Herstellers aus *E. coli* isoliert (siehe 2.6.3) und anschließend in HFF transfiziert (siehe 2.4.5). Für die Transfektion wurden in der Regel 5, 10 und 15 µl der isolierten DNA verwendet und mittels MaTra™ Reagenz (IBA, Göttingen) in die Zellen transfiziert.

2.5.3. Infektion von Säugierzellen

Zur Infektion von Säugierzellen wurden diese am Vortag subkonfluent ausgesät und über Nacht kultiviert. Um eine möglichst effektive Adsorption der Viruspartikel an die Zelloberfläche zu gewährleisten, wurde das Volumen des Zellkulturmediums reduziert und anschließend Virusüberstand entsprechend der gewünschten MOI zugegeben. Nach einer zweistündigen Adsorptionsphase im CO₂-Inkubator wurde ausreichend Medium zugegeben und die infizierten Zellen für den gewünschten Zeitraum weiter kultiviert.

2.5.4. Herstellung virushaltiger Überstände

Zur Gewinnung virushaltiger Zellkulturüberstände wurden HFF Zellen mit einer hohen Infektionsstärke (*multiplicity of infection*, MOI) infiziert und anschließend 6-8 Tage kultiviert. Der virushaltige Zellkulturüberstand wurde durch Zentrifugation (5 min, 3000 Upm bei RT in einer Megafuge 2.0) von Zelltrümmern befreit, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.5.5. Bestimmung des Virustiters

Reagenzien:

AEC-Stammlösung	400 mg AEC (3-Amino-9-Ethyl-Carbazol; Sigma (Deisenhofen)) in 100 ml DMF (Dimethylformamid)
Acetat-Puffer	6,8 g Natriumacetat in 2,88 ml Eisessig, pH 4,7

Die Bestimmung des Virustiters wurde im 96-Well Format mittels einer Immunfärbung des viralen IE1 Proteins durchgeführt und in IE1-positiven Einheiten pro Milliliter angegeben (IE⁺/ml). Dazu wurden 5×10^3 HFF/Well in 96-Well Platten (BD Falcon, Heidelberg) ausgesät und am folgenden Tag in 8 Replikaten mit 100 µl Virusüberstand infiziert. Der virushaltige Überstand wurde dazu in einer seriellen Verdünnungsreihe bis 1:10.000 verdünnt (10^{-4}) und die Verdünnungsstufen für die Infektion der HFF eingesetzt. Nach 48 h Inkubation im CO₂-Inkubator wurden die Zellen in PBS gewaschen und mit 100% technischem Ethanol für 20 min bei RT fixiert. Nach einem weiteren Waschschriff mit 1x PBS wurden 50 µl/Well Hybridomüberstand des monoklonalen IE1-spezifischen Antikörpers p63-27 unverdünnt zu den Zellen pipettiert. Nachfolgend wurden die Platten für 1 h in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Die Detektion der Bindung des Primärantikörpers erfolgte mittels Inkubation mit einem HRP-gekoppelten (Meerrettichperoxidase, *horseradish peroxidase*) Sekundärantikörper (Anti-Maus IgG, DAKO Hamburg: P0260) in einer feuchten Kammer bei 37°C für 1 h. Nach zwei Waschschriffen mit 1x PBS wurde die Bindung des Sekundärantikörpers mittels AEC-Färbung detektiert. Dazu wurde die AEC Stammlösung 1:20 in Acetat-Puffer verdünnt, filtriert und anschließend mit 0,001 Vol. einer 30%igen H₂O₂ Lösung versetzt. Von dieser Färbelösung wurden 100 µl je Vertiefung zu den Zellen gegeben und diese für eine weitere Stunde bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion durch Waschen mit PBS wurden die IE1-positiven Kerne, erkennbar durch eine deutliche Braunfärbung, im

Mikroskop ausgezählt (erfahrungsgemäß lag die Zahl positiver Kerne in der 10^{-4} Verdünnung im gewünschten Bereich zwischen 10 und 100 positiven Kernen pro Well).

Der Virustiter in IE^+ -Einheiten pro Milliliter berechnet sich nach folgender Formel:

Anzahl IE^+ positiver Einheiten pro Milliliter Virusüberstand:

$$\left(\left(\frac{Z}{N} \right) \right) \frac{1}{V} \times 10 = IE^+ / ml$$

Z Zahl gefärbter Kerne in allen Replikaten

N Anzahl Replikate

V Verdünnungsfaktor der ausgezählten Verdünnung (Bsp: 10^{-4})

x10 Es wurde mit 100 μ l Virusüberstand infiziert

2.5.6. Analyse der Virusreplikation

Um die Replikationsfähigkeit der in dieser Arbeit eingesetzten Virusstämme zu bestimmen, wurde die Replikationsfähigkeit der verschiedenen Mutanten anhand von Wachstumskinetiken analysiert. Dazu wurden HFF mit einer niedrigen MOI infiziert (0,1 bzw. 0,001) und im Verlauf der Infektion jeden Tag (über 7 Tage hinweg) oder jeden zweiten Tag (über 14 Tage hinweg) Proben des Zellkulturmediums entnommen. Diese Proben wurden bis zur Analyse bei -80°C aufbewahrt. Zur Messung der in den Proben vorhandenen Viren wurden zwei experimentelle Methoden verwendet. Zum einen wurden die IE^+ -positiven Einheiten pro Milliliter mittels Immunfärbung bestimmt (siehe 2.5.5). Alternativ wurde die Anzahl der in den Proben vorhandenen Virusgenome durch eine quantitative *Real-Time* PCR gemessen (siehe 2.6.11).

2.6. Isolation, Manipulation und Analyse von Nukleinsäuren

2.6.1. Verwendete Plasmide

Vektoren

puc18 / puc19 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985)

Bei diesen Klonierungsvektoren handelt es sich um Derivate des M13 Bakteriophagen mit einer verbesserten Replikationsfähigkeit. Diese Vektoren enthalten eine Ampicillinresistenz und sind für Blau/Weiß-Selektion geeignet.

pBluescript II SK (-/+) (Stratagene, Amsterdam, NL)

Der pBluescript Vektor besteht aus dem puc19 Plasmid und Sequenzabschnitten des Bakteriophagen F1. Er enthält die Promotoren der Phagen T7 und T3 flankierend zu einer multiplen Klonierungssequenz. Er eignet sich somit für die Klonierung und nachfolgende *in-vitro* Transkription ausgewählter Gene.

pcDNA6V5His (Invitrogen, Karlsruhe)

Dieser Klonierungsvektor wurde zur eukaryotischen Expression unter der Kontrolle des MIE (*major immediate early*) Promotors des humanen Cytomegalovirus entworfen. Dieses Plasmid enthält neben einer Ampicillinresistenz auch eine Blastidinresistenz zur Selektion in Säugerzellen, sowie einen DNA-Abschnitt, der für ein kurzes c-terminales Histidinmotiv kodiert. Durch geeignete Klonierung von Protein-kodierenden Genen wird ein mit einem „His-Tag“ versehenes Fusionsprotein generiert.

pKAR

Dieser auf puc19 basierende Klonierungsvektor enthält eine veränderte MCS (*multiple cloning site*) und ermöglicht damit die T/A-Klonierung von PCR Fragmenten. Dieser Vektor wurde von Sven Thirion kloniert und charakterisiert.

Vektorkonstrukte

Vektorkarten der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Konstrukte sind, soweit vorhanden, im Anhang aufgelistet.

pB SK(-) #5-2 / pB SK(-) #5-6

Hierbei handelt es sich um im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Vektoren zur Herstellung DIG-markierter einzelsträngiger RNA-Sonden durch T7-Polymerase vermittelte *in-vitro* Transkription. Die Plasmide bestehen aus pBluescript SK(-) Vektoren,

in die der Sequenzabschnitt des IE4-Introns, der auch zur Herstellung der DNA-Sonde #5 diente, in beiden Orientierungen inkloniert wurde.

pCDNAvIL10

Ein auf der Basis von pcDNA6V5His konstruierter Expressionsvektor, der die cDNA des IL10 Homologs UL111a des humanen Cytomegalovirus enthält (Tegeler, 2001).

pcDNA6-IE4

Dieses auf der Basis von pCDNA6V5His hergestellte Plasmid enthält ein *Bgl*III – *Sall* Fragment des IE4-Bereichs aus HCMV (Tegeler, 2001).

pCM1049

Dieses Cosmid enthält den ORF UL54 der als Zielsequenz für die TaqMan™ *Real-Time-PCR* zur Genomquantifizierung diente und als Plasmidstandard eingesetzt wurde (Fleckenstein *et al.*, 1982).

pGHS6

Dieses Plasmid enthält ein *Bam*HI-Subfragment des *Hind*III-E Fragments des HCMV Genoms (Jahn *et al.*, 1984). Das Insert dieses Moleküls enthält den gesamten IE4-Bereich.

pHM120

Dieses Plasmid auf der Basis von pBluescript SK(+) enthält die cDNA der IE2-mRNA (UL122) von HCMV und ist für die in-vitro Transkription geeignet. Dieses Plasmid wurde von Thomas Stamminger, Erlangen zur Verfügung gestellt.

pKK-IE4

Ein im Rahmen dieser Arbeit hergestellter Expressionsvektor basierend auf pcDNA6V5His, der den vollständigen IE4-Bereich aus dem Plasmid pGHS6 enthält.

pKK-IE4 Flag

Ein im Rahmen dieser Arbeit klonierter und charakterisierter Expressionsvektor auf der Basis von pcDNA6V5His. Dieser Vektor enthält einen Teil des IE4-Bereichs, wobei ein FlagTag™ direkt vor das vermutete Kozak-ATG des putativen IE4 ORFs gesetzt wurde (Rawlinson & Barrell, 1993).

pRR47

Dieses Plasmid enthält die genomische Sequenz des gesamten IE1/IE2 Bereichs des HCMV, kloniert in den Vektor puc18. Dieses Plasmid wurde von Rüdiger Rüger hergestellt und charakterisiert.

pT7IE1

Expressionsvektor auf der Basis von pcDNA6V5His, der die cDNA der IE1-mRNA von HCMV enthält. Da dieser Vektor einen T7 Promotor enthält ist dieses Konstrukt für *in-vitro* Transkription geeignet. Dieser Vektor wurde von Nadine Frankenberg hergestellt und charakterisiert.

Verwendete BACmide

pHB5

Dieses BACmid enthält das vollständige HCMV-Genom mit Ausnahme der Gene US2-US6, so dass aus diesem BACmid durch Transfektion permissiver Säugerzellen HCMV rekonstituiert werden kann (Borst *et al.*, 1999). Dieses Molekül stellt das Ausgangsplasmid für alle im Rahmen dieser Arbeit mittels BAC-Mutagenese hergestellten Virusmutanten dar.

Alle im Folgenden beschriebenen BACmide wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt und charakterisiert:

pBAC-KK-1

In diesem BACmid wurde durch BAC-Mutagenese ein Teil des IE4-Introns gegen eine AmpR-Kassette ausgetauscht. Dieser Abschnitt des Genoms entspricht der Deletion in der auf konventionellem Weg hergestellten Mutante RVAdIE4-2 #129.

pBAC-KK-2

Dieses BACmid stellt die Revertante des pBAC-KK-1 dar und entspricht weitgehend dem Wildtyp-BAC. Der wieder eingesetzte IE4-Bereich wird nur noch von einem aus 30 Bp bestehenden FRT-Motiv unterbrochen.

pBAC-KK-3 FLP

In diesem BACmid wurde das DNA-Motiv des Spleiß-Donors der IE4 RNA durch eine AmpR-Kassette, flankiert von FRT-Sites, unterbrochen. Durch Induktion der FLP-

Rekombinase wurde das Resistenzgen entfernt und die noch vorhandene Fremdsequenz auf eine FRT-Site reduziert.

pBAC-KK-4 FLP

In diesem BACmid wurde der dem vollständigen Intron des IE4 Transkripts entsprechende DNA-Abschnitt zwischen Spleiß-Donor und Spleiß-Akzeptor deletiert. Die dem Intron der IE4 RNA entsprechende Sequenz wurde durch eine AmpR-Kassette, flankiert von FRT-Sites, ersetzt. Durch Induktion der FLP-Rekombinase wurde das Resistenzgen entfernt und die noch vorhandene Fremdsequenz auf eine FRT-Site reduziert.

pBAC-KK-5

In diesem BACmid wurde ein großer Teil des ORFs UL111a deletiert. Der Bereich vom ersten Startcodon bis zum letzten alternativen Startcodon in Exon 3 wurde gegen eine AmpR-Kassette, die von FRT-sites flankiert wurde, ausgetauscht.

2.6.2. Verwendete Oligonukleotide

Sämtliche Oligonukleotide für quantitative *Real-Time* PCR wurden mit Hilfe der Software ABIPrism™ Primer Express 2.0 (Applied Biosystems, Weiterstadt) entworfen und von Operon Biotechnologies (Köln) bezogen. Oligonukleotide für PCR und RT-PCR wurden mit Hilfe des Softwarepakets „CloneManager Suite 7.0 “ (SciEd Central, NC, USA) entworfen, bearbeitet und von Metabion (Martinsried) synthetisiert. Oligonukleotide für die BAC-Mutagenese mit Längen über 100 Bp wurden mit Hilfe des Softwarepakets „CloneManager Suite 7.0 “ (SciEd Central, NC, USA) entworfen und von IBA (Göttingen) hergestellt. Die Sequenzen aller verwendeter Oligonukleotide sind im Anhang aufgeführt.

2.6.3. Isolation von DNA

Aufreinigung von Plasmiden

Zur Aufreinigung von Plasmid-DNA wurden Bakterienzellen nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Sambrook & Russell, 2001) unter der Verwendung der Puffer des „High Purity Plasmid Purification“ Systems (Marligen Bioscience, Vertrieben von BioCat, Heidelberg) aufgeschlossen. Um Plasmide in kleinem Maßstab zu gewinnen, wurden 1,5 ml einer *E. coli* Übernachtskultur für 30 s bei 14.000 Upm pelletiert und anschließend mit 200 µl gekühltem Suspensionspuffer (E1) resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl

alkalischem Lysepuffer (E2) und mehrmaligem Invertieren wurde die Präparation für 5 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 200 µl Neutralisierungspuffer (E3) wurde die ausgefallene chromosomale DNA durch Zentrifugation für 10 min bei 14.000 Upm und 4°C abgetrennt. Die Plasmid-DNA aus dem Überstand wurde anschließend mittels Isopropanolfällung aufkonzentriert und von Salzen gereinigt. Die DNA wurde je nach Anwendung in H₂O_{dest} oder TE-Puffer gelöst (10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH 8,0).

Zur Aufreinigung von größeren Mengen Plasmid-DNA mit höherem Reinheitsgrad wurde ebenfalls das „High Purity Plasmid Purification“ Systems verwendet. Es wurden 100 ml Übernachtkultur eingesetzt. Die Aufreinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers zur Aufreinigung von „*High copy number*“ Plasmiden, wobei der höhere Reinheitsgrad mit Hilfe eines Säulensystems mit Silica-Matrix erreicht wurde.

Aufreinigung von BACmiden

BACmide wurden ebenfalls mit Hilfe des „High Purity Plasmid Purification“ Kit von Marligen Bioscience (Vertrieben von BioCat, Heidelberg) isoliert. Die Aufreinigung erfolgte aus 200 ml Übernachtkultur nach Angaben des Herstellers zur Aufreinigung von „*low copy number*“ Plasmiden.

Isolation intrazellulärer und extrazellulärer HCMV DNA

Die Isolation von HCMV DNA aus infizierten Zellen erfolgte mit Hilfe des „High Pure Viral Nucleic Acid“ Kit von Roche (Mannheim) nach Angaben des Herstellers, wobei 2-5x10⁵ infizierte Zellen, resuspendiert in 200 µl Medium eingesetzt wurden. Diese Zellsuspension wurde mit 200 µl frisch hergestellter *working solution* und 50 µl Proteinase K für 10 min bei 72°C inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl Bindepuffer wurde die Lösung auf mit Silica-Matrix befüllte Säulchen aufgetragen. Die DNA wurde durch Zentrifugation bei 8.000 Upm in einer Tischzentrifuge an die Säulchen gebunden. Dabei ist zu beachten, dass die auf die DNA einwirkenden Kräfte während der Durchführung dieser Methode zu einer Fragmentierung der viralen Genome führten. Durch mehrere Waschschrte wurden Protein- und Salzkontaminationen möglichst vollständig entfernt und die gereinigten DNA-Fragmente anschließend in 50 µl Puffer eluiert.

Zur direkten Isolation von DNA aus freigesetzten Viruspartikeln wurde das „High Pure Viral Nucleic Acid“ Kit von Roche (Mannheim) verwendet. Es wurden 200 µl virushaltiger Zellkulturüberstand in die Isolation eingesetzt und nach Angaben des Herstellers behandelt.

2.6.4. Isolation von RNA

Gesamt-RNA für RT-PCR, Northern-Blots und *Real-Time* RT-PCR wurde mit Hilfe des „RNeasy Mini“ Kits von Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers aus Zellen isoliert. Dazu wurden bis zu 1×10^7 nicht infizierte Zellen (abhängig von Zelltyp) und bis zu 5×10^6 infizierte Zellen in RLT Puffer (+ β -Mercaptoethanol 10 μ l/ml) resuspendiert und durch Zentrifugation für 2 min bei 14.000 Upm in Qiashreddern™ homogenisiert. Nach Zugabe von einem Volumen 70%igem Ethanol (mit H_2O_{DEPC}) wurden die Lysate auf Säulchen geladen und nach einem Waschschrift mit RW-1 Puffer (10.000 g, RT, Tischzentrifuge) einem DNase I Verdau (RNase Free DNase I Set, Qiagen, Hilden) für 20 min bei RT unterzogen. Durch einen weiteren Waschschrift mit RW-1 Puffer und zwei Waschschriften mit RPE Puffer wurden Proteinverunreinigungen, DNA-Reste und kleinere RNA-Fragmente (≤ 70 nt) entfernt. Die an die Silica-Matrix des Säulchens gebundene RNA wurde in 50 μ l RNase freiem Wasser für mind. 1 min inkubiert und anschließend durch Zentrifugation eluiert.

2.6.5. Bearbeiten von Nukleinsäuren

Fällung

Zur Fällung von DNA wurde entweder eine Ethanol- oder eine Isopropanolfällung durchgeführt. Um DNA mittels Ethanol zu fällen, wurden 1/10 Volumen 3 M Natrium-Acetat Lsg. (pH 5,5) und 2,5 Volumen 100%iges Ethanol zugegeben. Anschließend wurde das Gemisch für mind. 2 h bei -20°C gefällt und danach die DNA durch Zentrifugation für mind. 30 min bei 14.000 Upm (Tischzentrifuge) und 4°C pelletiert. Das DNA-Pellet wurde mit eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen, 5 min zentrifugiert und anschließend an der Luft getrocknet. Die gereinigte DNA wurde in der gewünschten Menge TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) gelöst und ihre Konzentration mittels Adsorptionsmessung ($1 \text{ OD}_{260} = 50 \mu\text{g/ml DNA in } H_2O$) bestimmt. Die Fällung mittels Isopropanol wurde prinzipiell nach dem gleichen Protokoll durchgeführt, wobei jedoch nur 0,7–1 Volumen 100%iges Isopropanol zugesetzt wurde und die Präzipitation während des verlängerten Zentrifugationsschrittes erfolgte (Tischzentrifuge, 14.000 Upm, 4°C , 1 h).

Restriktionsendonuklease-Verdau

Zur Spaltung von Nucleinsäuren wurden Typ I Restriktionsendonucleasen verwendet. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Enzyme von NEB (Ipswich, USA) bezogen und nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

Dephosphorylierung

Um in Klonierungsreaktionen eine Religation „leerer“ Vektormoleküle zu verhindern, wurden diese nach dem Restriktionsverdau mit Hilfe der „*shrimp alkaline phosphatase*“ (SAP, Fermentas, Leon-Rot) am 5'-Ende dephosphoryliert. Zur Klonierung von PCR-Produkten wurden keine dephosphorylierten Vektoren eingesetzt, da PCR-Produkte nicht endständig phosphoryliert sind. Zur Dephosphorylierung wurden linearisierte Vektormoleküle (1-10 pmol freie Enden) in 1x SAP Reaktionspuffer und 1 U SAP (in 50 µl Endvolumen) bei 37°C für 1 h inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 65°C für 15 min abgestoppt.

Ligation

Zur Ligation von Restriktionsfragmenten mit Klonierungsvektoren wurde die T4-Ligase (NEB, Ipswich, USA) eingesetzt. Dieses Enzym katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 5'-Phosphatgruppen und 3'-Hydroxygruppen unter Verbrauch von ATP. Dazu wurden Pico-Mol freie Enden der Vektor- und Insertmoleküle im Verhältnis von 1:2 bei überhängenden DNA-Enden und T/A-Klonierungen bzw. im Verhältnis von 1:5 bei glatten Enden eingesetzt. Die Ligationen wurden über Nacht bei 16°C nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Durch Erhitzen auf 65°C für 10 min wurde die Reaktion abgestoppt. Die DNA wurde anschließend mit Hilfe des „Qiaquick PCR Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) gereinigt und zur Transformation elektrokompetente *E.coli* Zellen eingesetzt.

T/A Klonierung

Zur Klonierung von PCR-Produkten wurde die Methodik der T/A-Klonierung eingesetzt. Dabei wird die Tatsache ausgenutzt, dass DNA-Polymerasen ohne 3'-5'Korrekturlesefunktion (Taq-Polymerase) an das Ende der amplifizierten Sequenz ein zusätzliches Nucleotid ansynthetisieren, bei dem es sich zumeist um Adenosin handelt. Wird nun ein Klonierungsvektor eingesetzt, der einzelne überhängende Thymidinreste besitzt, kann dadurch die Ligationseffizienz im Vergleich zur Ligation mit glatten Enden

deutlich erhöht werden. Gleichzeitig sinkt die Häufigkeit von Religationen leerer Vektormoleküle. In dieser Arbeit wurde hierzu der Vektor pKAR verwendet, der einen Polylinker mit einer *XcmI* Schnittstelle in der „*Multiple Cloning Site*“ enthält. Wird dieser Vektor mit dem Enzym *XcmI* geschnitten, entsteht ein Fragment mit T-Überhängen, das in die Ligationsreaktion eingesetzt werden kann.

Sequenzierung

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Sequenzierungen wurden bei der Firma „Genterprise Genomics“ (Mainz) in Auftrag gegeben. Die zu sequenzierenden DNA Moleküle wurden nach den Vorgaben des Unternehmens vorbereitet (Sequenzierprimer siehe 2.6.2).

Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Zur Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen wurde die zu messende Nukleinsäurelösung 1:100 in TE (10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH 8,0) verdünnt und anschließend die optische Dichte dieser Lösung in einem Bio-Photometer (Eppendorf, Hamburg) bei 260 und 280 nm gemessen (Wilfinger *et al.*, 1997). Je nach Art der zu messenden Nukleinsäure gelten dabei folgend Umrechnungsfaktoren:

DNA: 1 OD₂₆₀ von dsDNA = 50 µg/ml in H₂O

RNA: 1 OD₂₆₀ von ssRNA = 40 µg/ml in H₂O

Das Verhältnis zwischen OD₂₆₀ und OD₂₈₀ wird dabei zur Abschätzung der Reinheit der Nukleinsäure herangezogen, wobei DNA-Lösungen mit Werten $\geq 1,8$ und RNA-Lösungen mit Werten $\geq 2,0$ als rein angesehen werden können.

2.6.6. BAC-Mutagenese

Zur Klonierung großer DNA Fragmente werden *bacterial artificial chromosomes* (BAC's) eingesetzt. Dabei handelt es sich um Vektoren, die auf den F-Faktoren, den natürlichen Sexplasmiden von *E.coli*, basieren und Fragmente bis zu 300 kb aufnehmen können (Shizuya *et al.*, 1992). Die Verwendung dieser Vektoren ermöglicht es, komplette Genome großer DNA Viren stabil in *E.coli* zu vermehren und dadurch der genetischen Manipulation in den Bakterien zugänglich zu machen. So ist es möglich BACmide, die das komplette HCMV-Genom enthalten, mittels homologer Rekombination punktgenau

zu mutagenisieren (Borst *et al.*, 1999). Hierzu werden die Bakterien, die das HCMV-BACmid tragen mit linearen DNA-Fragmenten transformiert, die bakterielle Resistenzgene kodieren. Durch flankierende DNA-Abschnitte von mindestens 40 Bp Länge mit Homologie zum HCMV-Genom wird es ermöglicht, diese Kassetten punktgenau über homologe Rekombination in die virale DNA zu inserieren. Die Auswahl der flankierenden Sequenzen legt fest, welche Bereiche im HCMV-Genom deletiert werden. Die rekombinanten BACmide können in der Folge über die Expression des Resistenzgens auf Selektivmedien isoliert werden. Um die Effizienz dieser Rekombinationsvorgänge zu erhöhen, wurde ein defekter λ -Prophage in das Genom von *E.coli* integriert (*E.coli* EL250), der unter der Kontrolle des temperatursensitiven Repressors *ci875* das Operon *PL* exprimiert (Lee *et al.*, 2001). Dieses Operon enthält das *red*-Rekombinationssystem des λ -Phagen, das aus den Genen *gam*, *exo* und *beta* besteht. Das *gam*-Genprodukt hemmt die RecBCD Nuklease des Reparatursystems der *E.coli* Zelle und verhindert somit den Abbau der transformierten linearen Kasette. Dies ermöglicht den Einsatz linearer DNA zur Transformation und nachfolgender Rekombination in die BAC-DNA. Die Produkte der Gene *exo* und *beta* bewerkstelligen die Rekombination der homologen Überhänge mit dem BACmid und sind dabei 50- bis 100-fach effektiver als das Reparatursystem der *E.coli* Zelle (Murphy, 1998; Lee *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2003).

Herstellung von Rekombinations-Kassetten

In dieser Arbeit wurden die benötigten Resistenz-Kassetten entweder mit Hilfe einer PCR oder mittels Klonierung hergestellt. Zur Herstellung der Resistenzkassetten über PCR wurden Primer verwendet, die das eingesetzte Resistenzgen amplifizierten und dabei zusätzlich die benötigten homologen 40 Bp-Überhänge trugen. Die PCR wurde nach dem in 2.6.9 beschriebenen Protokoll durchgeführt.

In einigen Fällen wurde die Sequenz der zur Amplifikation verwendeten Primer so gewählt, dass das jeweilige Resistenzgen nach der Amplifikation von so genannten FRT-Motiven flankiert wurde. Derartige FRT-Motive werden sequenzspezifisch von der FLP-Rekombinase aus *Saccharomyces cerevisiae* erkannt. Bei gleicher Orientierung der FRT-Motive schneidet die FLP-Rekombinase punktgenau den dazwischen liegenden DNA-Abschnitt aus. Dieses Flankieren des Resistenzmarkers mit FRT-Motiven bietet den Vorteil, dass dieses Gen nach erfolgter Selektion sehr effizient aus der DNA des isolierten BAC-Klons entfernt werden konnte.

Homologe Rekombination in EL250

Zur Mutagenese von BACmiden in *E.coli* EL250 wurden elektrokompetente BACmid-tragende Zellen hergestellt (siehe 2.3.5) und mit 500 ng DNA transformiert. Anschließend wurde auf das Chloramphenicol-Resistenzgen (Selektionsmarker des BAC-Vektors) und die jeweils verwendete Resistenz selektioniert. Die Einzelkolonien wurden nach einem Verdünnungsausstrich mittels Kolonie-PCR auf den Einbau der Kasette an der gewünschten Position getestet. Diese PCR-Produkte wurden zur weiteren Analyse sequenziert und die erhaltenen Sequenzen mit Hilfe des Programms „CloneManager 7.0“ (Sci Ed Central, NC, USA) untersucht.

Entfernen der Selektionskassette durch FLP-Rekombination

Sollten die zur BAC-Mutagenese verwendeten Selektionsmarker anschließend wieder entfernt werden, wurden zur Herstellung der Selektionskassetten Primer mit FRT-Motiven verwendet. Zur Entfernung der Selektionsmarker wurden zunächst 5 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 32°C kultiviert. Am nächsten Tag wurden 10 ml LB-Medium mit 1 ml der ÜN-Kultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 kultiviert. Zur Induktion der Expression der FLP-Rekombinase wurden anschließend 10% Arabinose zugesetzt und die Bakterien für eine weitere Stunde bei 32°C inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend in geeigneten Verdünnungen parallel auf LB-Agarplatten mit bzw. ohne das verwendete Selektionsantibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 32°C kultiviert. Bei erfolgreicher FLP-Rekombination hatten die Bakterien den Selektionsmarker verloren und waren sensitiv für das verwendete Antibiotikum. Da die FRT-Sites in den im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Mutanten in den Überhängen der Primer enthalten waren, konnte die in das Genom eingeführte Fremdsequenz in den mutierten BACmiden nach erfolgreicher FLP-Rekombination auf eine nur 30 bp lange FRT-site reduziert werden.

2.6.7. Gelelektrophorese

DNA

Reagenzien:

10x TBE-Puffer:	89 mM TRIS-Borat, 2 mM EDTA, pH 8,0
6x Auftragspuffer:	50 mg Bromphenolblau, 100 mg Xylencyanol, 1 mM EDTA, 25 g Saccharose, ad 50 ml H ₂ O

Zur Analyse, Bestimmung des Molekulargewichts und Aufreinigung von DNA wurde die Methodik der Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Je nach Molekulargewicht der zu untersuchenden DNA-Moleküle wurden 0,5% - 2% Agarose (w/v) in 1x TBE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht, auf 50°C abgekühlt, mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in die entsprechende Gelapparatur gegossen. Die zu untersuchende DNA wurde im Verhältnis von 6:1 mit Auftragspuffer versetzt und das Gemisch anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte je nach Laufzeit und Fragmentgröße bei 2,5-4 V/cm in 1x TBE-Puffer. Als Referenz zur Bestimmung des Molekulargewichts wurden 0,5 µg „1-kb-Ladder“-Größenmarker von PeqLab (Erlangen) verwendet.

RNA

Reagenzien:

10x MOPS-Puffer:	200 mM MOPS, 50 mM Na-Acetat, 20 mM EDTA, ad H ₂ O _{DEPC} , pH 7,0
1x Auftragspuffer:	1x MOPS-Puffer, 50% Formamid (deionisiert), 6% Formaldehyd, 0,05% Bromphenolblau, 10% Glycerin, ad H ₂ O _{DEPC}

Alle Lösungen und Apparaturen müssen RNase-frei sein.

Zur Analyse von RNA wurde die denaturierende Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Als denaturierendes Reagenz wurde Formaldehyd in Verbindung mit Morpholinopropansulfonsäure-(MOPS) Puffer eingesetzt. Standardmäßig wurde 1% (w/v) Agarose in 1x MOPS-Puffer aufgeköcht, auf 50°C abgekühlt, mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid und 0,6% Formaldehyd versetzt und in die Gelapparatur gegeben. Nach Verfestigung des Gels wurde dieses mind. 30 min in Laufpuffer (100 ml 10x MOPS-Puffer, 20 ml Formaldehyd 37%, 880 ml H₂O_{DEPC}) äquilibriert. Maximal 15 µg RNA wurden mit Auftragspuffer versetzt, für 10 min bei 65°C denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde bei 5 V/cm bei 4°C durchgeführt. Als Größenstandard wurden 2,5 µg „ssRNA-Ladder“ von NEB (Ipswich, USA) in 1x Auftragspuffer eingesetzt.

2.6.8. Gelelution

Um DNA Fragmente aufzureinigen, wurden diese nach einer Auftrennung über Gelelektrophorese aus den Agarose-Gelen isoliert. Dazu wurde das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Mit dieser Methode können Fragmente zwischen 70 Bp und 10.000 Bp eluiert werden.

2.6.9. Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) stellt eine sehr empfindliche Methode zur Amplifikation von spezifischen DNA Abschnitten *in-vitro* dar (Saiki *et al.*, 1988). Diese Methode bedient sich den grundlegenden Abläufen der DNA-Replikation. Es werden künstliche Oligonukleotide (Primer) verwendet, um den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt festzulegen. Als Polymerase dient dabei ein Enzym aus thermophilen Bakterien z. B. die *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus*. Die Verwendung dieses Enzyms ermöglicht es, das DNA-Molekül (*Template*), das den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt enthält, zyklisch durch Aufkochen zu denaturieren und somit mehrere Replikationsschritte zu verketteten. Dieser zyklische Aufbau ermöglicht eine theoretisch exponentielle Vermehrung der Zielsequenz.

Durchführung einer PCR

Alle in dieser Arbeit verwendeten PCR-Programme und PCR-Ansätze stellen Optimierungen des folgenden Standardprotokolls dar. Die PCR wurde in einem Endvolumen von 50 µl in 1x PCR Puffer durchgeführt. Auf Eis wurden 1,5 mM MgCl₂ (Stammlsg: 25 mM, oder bereits in „*complete PCR-buffer*“ enthalten), 200 µM dNTP's (Stammlsg: 10 mM), Primer je 2 µM (Stammlsg: 100 µM) und 2,5 U *Taq*-Polymerase (Metabion, Martinsried) mit 1x PCR Puffer versetzt. Um die Amplifikation von Primerdimeren oder unspezifischen Produkten zu verhindern, wurde die Spezifität der Reaktion entweder durch Zugabe von bis zu 10% DMSO oder der Zugabe der Polymerase nach der initialen Denaturierung erhöht (*hot start*). Um PCR-Produkte mit möglichst geringen Fehlerraten zu erhalten, wurde bei Bedarf statt der *Taq*-Polymerase eine Polymerase mit Korrekturlesefunktion verwendet (z. B. *Pfu*-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* mit 3'-5'-Exonuclease Aktivität).

Standard PCR-Programm:

Initiale Denaturierung	3-5 min	95°C	Danach Zugabe der Polymerase bei <i>hot start</i>
3-Schritt Zyklen			
Denaturierung	30-60 s	94°C	
Annealing	30-60 s	50-68°C	In Abhängigkeit der Primer-Sequenz

Extension	60s/1 kbp	72°C
Zyklenzahl	30-40	
Ende	∞	4°C

Kolonie-PCR

Um transfizierte Bakterienklone hinsichtlich einer gewünschten Nukleotidsequenz zu untersuchen, wurden Kolonie-PCRs durchgeführt. Dazu wurden Einzelkolonien von einer Agarplatte gepickt und der verwendete Zahnstocher in 50 µl H₂O_{dest} abgestreift. Diese Bakteriensuspension wurde für 5 min bei 100°C denaturiert und für 30 sec bei 14.000 Upm abzentrifugiert (Tischzentrifuge). Anschließend wurden 5 µl dieser DNA-Suspension als *Template* in die PCR-Reaktion eingesetzt.

Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion

Um Transkripte nachzuweisen oder cDNA- (*complementary DNA*, cDNA) Klonierungen durchzuführen, wurden Reverse Transkriptase PCRs (RT-PCRs) durchgeführt. Dabei wurde zunächst mit Hilfe von reversen Transkriptasen (OmniScript, SensiScript von Qiagen, Hilden) cDNA aus dem gewünschten RNA-Molekül hergestellt. Diese cDNA diente dann als *Template* in einer nachfolgenden DNA-PCR Reaktion. Mit Hilfe des OneStep RT-PCR Kit™ (Qiagen, Hilden) konnten die Synthese der cDNA und die anschließende PCR direkt aufeinander folgend in einem Reaktionsgefäß durchgeführt werden. Der Ablauf erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Standard RT-PCR Programm

Reverse Transkription	30 min	50°C	Umschreiben in cDNA
Initiale Denaturierung	15 min	95°C	Aktivierung der <i>HotStar</i> ™ Taq
3-Schritt Zyklen			
Denaturierung	30-60 s	94°C	
Annealing	30-60 s	50-68°C	In Abhängigkeit der Primer-Sequenz

Extension	60s/1 kbp	72°C
Zyklenzahl	30-40	
Ende	∞	4°C

2.6.10. Quantitative *Real-Time* PCR

Die Technologie der *Real-Time* PCR ermöglicht es, die Zunahme an PCR-Produkt mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen in Echtzeit im Reaktionsgefäß zu beobachten. Die Amplifikation eines PCR-Produkts lässt sich mit einem sigmoidalen Graphen beschreiben (Abb 2.1). Nach einer Initialisierungsphase beginnt eine exponentielle Amplifikationsphase, in der sich unter optimalen Bedingungen die Zahl der PCR-Produkte mit jedem Zyklus verdoppelt. Dieser exponentiellen Phase folgt eine Plateauphase, in der limitierende Faktoren, wie die abnehmende Menge an freien Primern und dNTP's, sowie die sich verringerende Stabilität der Polymerase und das häufigere *Re-annealing* der Produkte, die Effizienz der PCR beeinträchtigen und die Amplifikation sich verlangsamt. In der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion ist die Menge des *Templates* direkt proportional zu der gemessenen Fluoreszenz. Daher lässt sich die Zunahme der Fluoreszenz mit den gleichen mathematischen Formeln beschreiben wie sie auch zur Beschreibung der Amplifikation des *Templates* verwendet werden. Die Anzahl an Amplifikaten zu einem beliebigen Zyklus der Reaktion lässt sich mit folgender Gleichung beschreiben:

$$N = N_0 \times (1 + E_{PCR})^n$$

N	=	Anzahl PCR-Produkte
N ₀	=	Ausgangsmenge <i>Template</i>
E _{PCR}	=	Effizienz
n	=	Anzahl der Zyklen

Selbst bei einer optimalen PCR-Reaktion kann die Effizienz nur maximal den Wert 1 (= 100%) annehmen, was zu einer Basis von 2 für den exponentiellen Ausdruck führt. Die Begrenzung der Effizienz auf 100% liegt in der Natur der Reaktion selbst begründet, da in einem Zyklus höchstens eine Verdoppelung der vorhandenen Moleküle möglich ist. Vergleicht man also PCR-Reaktionen mit gleicher Effizienz, dann ist die Höhe der

gemessenen Fluoreszenz in einem bestimmten Zyklus nur von der ursprünglich eingesetzten *Template*-Menge abhängig. Diese Tatsache ermöglicht es also, bei bekannter Effizienz, mit Hilfe der gemessenen Fluoreszenz die ursprüngliche *Template*-Menge zu bestimmen.

Zur Detektion der PCR-Produkte stehen verschiedene Systeme zur Verfügung. Für die sequenzunspezifischen Systeme werden interkalierende Fluorochrome verwendet, die an doppelsträngige DNA binden. Zunächst wurde Ethidiumbromid eingesetzt (Higuchi *et al.*, 1992; Higuchi *et al.*, 1993), das jedoch bald von besser geeigneten Farbstoffen, mit geringerer Giftigkeit und stärkerer Fluoreszenz, abgelöst wurde (Hoechst 33258, YO-PRO-1 und SYBR-GREEN I). Diese Farbstoffe binden jedoch nicht nur an das spezifische PCR-Produkt, sondern auch an unspezifische Nebenprodukte und Primerdimere. Um die Aussagekraft dieser sequenzunabhängigen Detektionssysteme zu erhöhen, werden daher im Anschluss an die eigentliche Reaktion Schmelzkurvenanalysen durchgeführt. Dazu wird die Temperatur langsam und kontinuierlich erhöht (50°C - 95°C), wodurch die doppelsträngigen DNA-Moleküle aufschmelzen und die interkalierenden Farbstoffe freigesetzt werden. Die Abnahme der Fluoreszenz wird gemessen, wobei Primerdimere und unspezifische Produkte durch die abweichenden Schmelztemperaturen von den zu untersuchenden Amplifikaten unterschieden und nachgewiesen werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das QuantiTect® SYBR-GREEN® RT-PCR System (Qiagen, Hilden) eingesetzt, um absolute und relative Quantifizierung von RNA-Transkripten durchzuführen (Siehe 2.6.11).

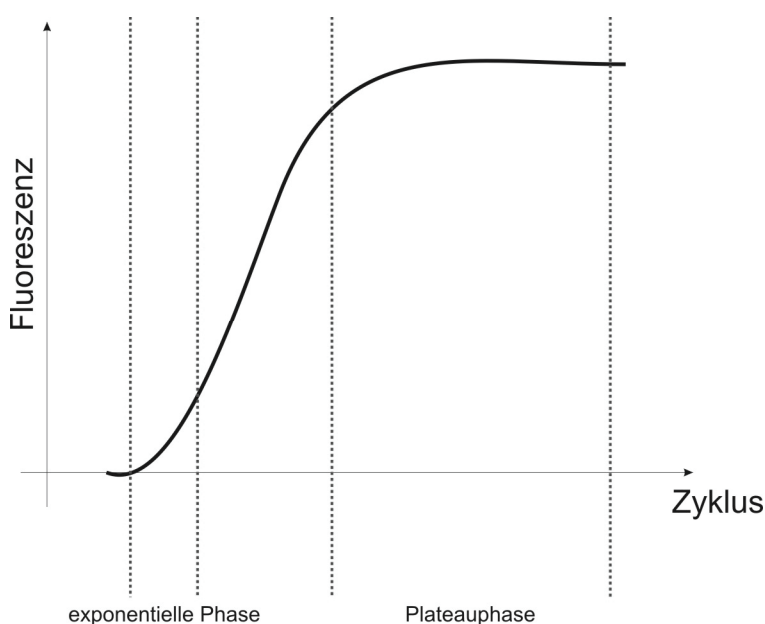


Abb. 2.1:
Schematische Darstellung des sigmoidalen Verlaufs einer Real-Time PCR-Reaktion. Die Messung der Fluoreszenz zur Bestimmung der Menge des *Templates* wird in der exponentiellen Phase vorgenommen, da dann die PCR im Gegensatz zur Plateauphase mit maximaler Effizienz abläuft und die gemessene Fluoreszenz proportional zur *Template*-Menge ist.

Die sequenzspezifischen Detektionssysteme verwenden DNA-Sonden, die an Fluorochrome gekoppelt sind (TaqMan[®]-Sonden, Molecular Beacons, FRET-Sonden). In diesen Systemen ist der Einfluss von unspezifischen Nebenprodukten und Primerdimeren auf das gemessene Signal weitaus geringer. Zur Quantifizierung von HCMV Genomen wurde im Rahmen dieser Arbeit eine *Real-Time* PCR mit TaqMan[®]-Sonden durchgeführt (Livak *et al.*, 1995). TaqMan[®]-Sonden sind kurze Oligonukleotide, die an ihrem 5' bzw. 3' Ende jeweils ein Fluorochrom (6-FAM als Reporter am 5'-Ende bzw. TAMRA als Quencher am 3'-Ende) tragen. Dabei handelt es sich um Farbstoffe mit überlappenden Emissions- bzw. Absorptionsspektren. Durch diese Überlappung der Spektren tritt der so genannte Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) auf, wodurch die Fluoreszenz des Reporters unterdrückt wird, so lange er sich in enger räumlicher Nähe zum Quencher befindet. Das vom Fluorochrom emittierte Licht wird vollständig vom Quencher absorbiert, der dadurch selbst zur Fluoreszenz angeregt wird. Das Oligonucleotid ist komplementär zu einem Sequenzabschnitt, der zwischen den verwendeten Primern liegt, so dass die Polymerase während des Amplifikationsschritts die TaqMan[®] Sonde verdrängen muss. Da die Polymerase über eine 5'-3'-Exonucleaseaktivität verfügt, wird die TaqMan[®] Sonde nicht nur verdrängt, sondern dabei auch hydrolysiert. Dadurch werden die Fluorochrome freigesetzt, was dazu führt, dass die Fluoreszenz des Reporters nicht länger durch den Quencher unterdrückt werden kann. Mit jedem Amplifikationszyklus steigt daher die detektierte Fluoreszenz des Reporters direkt proportional zur Anzahl der amplifizierten Zielsequenzen an.

2.6.11. Quantitative *Real-Time* RT-PCR

Die Systeme der quantitativen *Real-Time* PCR lassen sich auch auf RNA-Moleküle anwenden, wodurch es ermöglicht wird, die Menge eines bestimmten Transkripts absolut oder relativ zu bestimmen. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit durch die Kombination einer OneStep-RT-PCR[™] mit der Real-Time Technologie bewerkstelligt (QuantiTect[®] SYBR-GREEN[®] RT-PCR System (Qiagen, Hilden)). Die zu untersuchende RNA wird zunächst mit der Hilfe genspezifischer Primer und einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben, welche anschließend als *Template* für die *Real-Time* PCR dient.

2.6.12. Genomquantifizierung mit einer TaqMan[™] Sonde

Zur absoluten Quantifizierung von HCMV Genomen (zur Isolation von Virusgenomen siehe 2.6.3) wurde eine quantitative Real-Time PCR mit einer TaqMan[®]-Sonde (TIB

Molbiol GmbH, Berlin) in einem ABIPrism™ 7700 Real-Time Cycler durchgeführt. Es wurde eine gegen den ORF UL54 des HCMV Genoms gerichtete Sonde verwendet und die Zielsequenz im ORF UL54 mit Hilfe der *HotStar* Taq von Qiagen (Hilden) amplifiziert.

Rezeptur für einen TaqMan® Ansatz für ABIPrism™ 7700:

Stammlösung	Menge für 50 µl
10x PCR Puffer (15 mM MgCl ₂)	5 µl
25 mM MgCl ₂	2 µl
H ₂ O	17,25 µl
2 mM dNTP`s	5 µl
3 µM Primer fwd	5 µl
3 µM Primer rev	5 µl
1 µM Sonde	5 µl
100 mM ROX	0,25 µl
Qiagen <i>HotStar</i> Taq	0,5 µl
+ <i>Template</i> /Standard	5 µl

Als Reaktionsgefäße wurden 8x PCR-Steifen (Greiner BioOne, Nürtingen) mit Runddeckeln eingesetzt. Alle Proben wurden in Tripletts gemessen.

PCR-Programm für ABIPrism™ 7700:

Initialer Aktivierungsschritt	15 min	95°C	Aktivierung der <i>HotStar</i> Taq-DNA-Polymerase
2-Schritt Zyklen			
Denaturierung	15 s	94°C	
Annealing/Extension	1 min	60°C	Daten Akquisition
Zyklenzahl	45		

Als Plasmidstandard für die absolute Quantifizierung wurde das Cosmid pCM1049 verwendet, der eine Kopie des UL54 ORFs enthält. Das Plasmid wurde linearisiert, gereinigt und mit Hilfe der UV-Spektrometrie auf eine definierte Molekülmenge in H₂O_{bidest} eingestellt. Dazu wurde folgende Gleichung angewendet:

$$\text{Molekülmenge [Plasmide/}\mu\text{l]} = \frac{6 \times 10^{23} [\text{Kopien/mol}] \times \text{Konzentration [g/}\mu\text{l}]}{\text{MW [g/mol]}}$$

Konzentration: Plasmidkonzentration in g/ μ l

MW für dsDNA: Plasmidgröße [bp] x 660 Dalton/bp

Mit Hilfe einer Verdünnungsreihe dieses Plasmidstandards ($3,5 \times 10^6$ Kopien – $3,5 \times 10^1$ Kopien) wurde bei jeder Messung eine Eichkurve erstellt, anhand derer die absolute Zahl an HCMV Genomen in den zu untersuchenden Proben bestimmt werden konnte. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Betriebssoftware des ABIPrism™ 7700. Dazu wurden die C_T -Werte (*threshold cycle*) der Standardverdünnungsreihe halblogarithmisch gegen die entsprechenden Kopiezahlen des *Templates* aufgetragen, wobei der C_T -Wert einer Reaktion dem Zyklus der PCR entspricht, in dem die gemessene Probe einen festgelegten Fluoreszenzschwellenwert erreicht. Der Schwellenwert wurde so gewählt, dass er sich in der exponentiellen Phase der untersuchten PCR befand (siehe Abb. 2.1). Dadurch konnten den C_T -Werten der unbekanntenen Proben *Template*-Kopiezahlen zugeordnet werden.

2.6.13. Transkriptquantifizierung mit SYBR-GREEN

Absolute Quantifizierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die quantitative *Real-Time* RT-PCR zur Bestimmung der Mengen von IE1 und IE2 mRNAs in infizierten Zellen eingesetzt. Die absolute Quantifizierung wurde mit Hilfe des QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kits (Qiagen, Hilden) auf einem ABIPrism™ 7500 Real Time PCR System durchgeführt. Als *Template* dienten pro Reaktionsansatz 50 ng Gesamt-RNA aus infizierten HFF Zellen, wobei *in-vitro* Transkripte der Plasmide pT7IE1 (IE1 cDNA) und pHM120 (IE2 cDNA) als Molekülstandards mit bekannten Kopiezahlen verwendet wurden. Die Transkripte wurden wie in Kapitel 2.6.13 beschrieben hergestellt und in unterschiedlichen Verdünnungen als Standardreihe eingesetzt. Die gemessenen C_T -Werte der verschiedenen Molekülstandards wurden dazu verwendet eine Eichkurve zu erstellen, mit deren Hilfe dann die C_T -Werte der zu untersuchenden Proben in Kopiezahlen umgerechnet werden konnten. Die Analyse erfolgte mit Hilfe der Betriebssoftware des ABIPrism™ 7500 Systems.

Rezeptur für einen SYBR-Green RT-PCR Ansatz mit dem ABIPrism™ 7500:

Stammlösung	Menge für 20 µl
2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix	10 µl
H ₂ O	8,4 µl
100 µM Primer fwd	0,2 µl
100 µM Primer rev	0,2 µl
QuantiTect RT Enzym Mix	0,2 µl
+ <i>Template</i> /Standard	1 µl (50 ng RNA)

Es wurde der Ansatz nach Handbuch für das LightCycler™ System mit 20 µl Endvolumen verwendet. Alle Proben wurden in Triplets gemessen.

PCR-Programm für ABIPrism™ 7500:

Reverse Transkription	30 min	50°C	Umschreiben in cDNA
Initialer Aktivierungsschritt	15 min	95°C	Aktivierung der <i>HotStar</i> Taq-DNA-Polymerase
3-Schritt Zyklen			
Denaturierung	15 s	94°C	
Annealing	30 s	60°C	
Extension	60 s	72°C	Daten Akquisition
Zyklenzahl	45		
Dissoziationskurve			Nachweis unspezifischer Nebenprodukte durch Schmelzkurvenanalyse

Relative Quantifizierung viraler Transkripte mit der komparativen Methode

Relative Quantifizierungen wurden mit Hilfe des QuantiTect SYBR Green RT-PCR System (Qiagen, Hilden) in einem ABIPrism™7500 Real Time PCR System durchgeführt (PCR-Ansatz und Programm siehe oben). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression mehrerer früher HCMV Gene untersucht und zwischen Wildtypstämmen und Mutanten verglichen. Da die Expression der zu untersuchenden Gene in unserem

System auf die Expression dieser Gene im Wildtyp bezogen wurde, diente der Wildtypstamm als Kalibrator. Um die eingesetzten Gesamt-RNA Mengen vergleichen zu können, wurde als Bezugsgröße die Expression eines zellulären Gens verwendet (= endogene Kontrolle). In dieser Arbeit wurde das zelluläre Gen Cyclophilin als endogene Kontrolle gewählt. Die Analyse der relativen Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der Systemsoftware des ABIPrism™ Systems nach der komparativen ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) Methode (Livak & Schmittgen, 2001). Bei diesem Verfahren wird die Expression der zu untersuchenden Gene in den Mutanten mit der Expression dieser Gene im Wildtyp (= Kalibrator) verglichen, ohne dabei die absoluten Kopiezahlen der zu untersuchenden Transkripte zu bestimmen, sondern nur deren relative Häufigkeit im Vergleich zum Kalibrator. Dazu werden die C_T -Werte der Virusmutanten und des Wildtyps für jedes zu untersuchende Gen und die endogene Kontrolle bestimmt. Der C_T -Wert stellt den Zyklus dar, in dem die Fluoreszenz der Proben einen festgelegten Schwellenwert erreicht. Mit Hilfe der in Abschnitt 2.6.9 beschriebenen Formel lässt sich für den Zyklus C_T die Menge an Amplifikaten berechnen,

$$X_{C_T} = X_0 \times (1 + E_{PCR})^{C_T}$$

sowohl für die zu untersuchenden Gene, wie auch für die endogene Kontrolle. Die endogene Kontrolle (Cyclophilin) ist ein zelluläres Gen und dient dazu Schwankungen des mRNA-Anteils in der eingesetzten Gesamt-RNA auszugleichen. Alle zu untersuchenden Gene wurden also auf die endogene Kontrolle normiert. Dazu wurde jeweils der mathematische Ausdruck für die Amplifikate im Zyklus C_T des zu untersuchenden Gens durch den der endogenen Kontrolle dividiert. Bei Anwendung der komparativen ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) Methode wird vereinfachend angenommen, dass die Effizienz (E_{PCR}) in beiden Reaktionen identisch ist, wodurch sich die Division der beiden exponentiellen Ausdrücke, aufgrund der gleichen Basis, durch die Differenz der Exponenten ausdrücken ließ.

$$\text{Normierte Amplifikatmenge zum Zeitpunkt } C_T : \frac{X_0}{R_0} \times (1 + E_{PCR})^{C_T(X) - C_T(R)} = K$$

vereinfacht zu:

$$X_N \times (1 + E_{PCR})^{\Delta C_T} = K$$

Aufgelöst nach X_N :

$$K \times (1 + E_{PCR})^{-\Delta C_T} = X_N$$

X_0	=	ursprüngliche <i>Template</i> -Menge zu untersuchendes Gen
R_0	=	ursprüngliche <i>Template</i> -Menge endogene Kontrolle
X_N	=	normierte <i>Template</i> -Menge zu untersuchendes Gen
E_{PCR}	=	Effizienz der PCR Reaktionen
$C_T(X)$	=	C_T -Wert des zu untersuchenden Gens
$C_T(R)$	=	C_T -Wert der endogenen Kontrolle
K	=	Konstante
ΔC_T	=	$C_T(X) - C_T(R)$

Da die Expression der zu untersuchenden Gene in unserem System auf die Expression im Wildtyp bezogen wurde, stellt der Wildtyp den so genannten Kalibrator dar. Um nun die relative Expression zu bestimmen wurde die normierte *Template*-Menge der zu untersuchenden Gene der Virusmutanten auf die normierte *Template*-Menge der zu untersuchenden Gene des Kalibrators bezogen.

$$\text{Relative Expression} = \frac{X_{N \text{ Gen}}}{X_{N \text{ Kalibrator}}}$$

Auch bei der Division normierter *Template*-Mengen gilt, dass sich diese Gleichung aufgrund der gleichen Basis der exponentiellen Ausdrücke als eine Subtraktion der Exponenten darstellen lässt. Diese Darstellung und das Kürzen der konstanten Faktoren in der Gleichung führen zu dem Ausdruck

$$(1 + E_{PCR})^{-(\Delta C_{T \text{ Gen}} - \Delta C_{T \text{ Kalibrator}})}$$

Vereinfacht zu:

$$(1 + E_{PCR})^{-\Delta \Delta C_T}$$

Bei der Anwendung der komparativen Methode wird außerdem vorausgesetzt, dass die Effizienzen der Reaktionen nahe an 100% liegen. Daher fließt die Effizienz mit dem Wert 1 in die Gleichung ein, wodurch sich die Gleichung zu dem endgültigen Ausdruck der komparativen Methode vereinfachen lässt

$$\text{Relative Genexpression} = (1 + 1)^{-\Delta \Delta C_T} = 2^{-\Delta \Delta C_T}$$

Die aus dieser Analyse erhaltene Größe RQ (Relative Quantität) gibt an, wie viel häufiger oder seltener ein bestimmtes Transkript einer Mutante verglichen mit dem Kalibrator (Wildtyp) ist.

Fehlerfortpflanzung:

Da die C_T -Werte, die in diese Gleichungen einfließen, in Replikaten bestimmt werden, fließt auch die Varianz dieser Werte in die Gleichung ein und bestimmt die Genauigkeit, mit der RQ gemessen werden kann (Livak & Schmittgen, 2001). Im Falle der komparativen Methode wird die Standardabweichung von RQ durch folgende Gleichung aus der Standardabweichung der eingesetzten C_T -Werte berechnet:

$$\text{StdAbw } (-\Delta\Delta C_T) = \text{StdAbw } (-\Delta C_T)$$

$$\text{StdAbw } (-\Delta C_T) = \sqrt{(S_1)^2 + (S_2)^2}$$

$$S_1 = \text{StdAbw } C_T\text{-Wert}_{\text{Gen}}$$

$$S_2 = \text{StdAbw } C_T\text{-Wert}_{\text{endogene Kontrolle}}$$

Effizienzvalidierung:

Bei Anwendung der komparativen Methode wird angenommen, dass die PCR-Effizienzen der endogenen Kontrolle und der zu untersuchenden Gene gleich sind. Die Annahme vergleichbarer PCR-Effizienzen erlaubt es, auf Standardkurven zu verzichten. Dieser Vorteil lässt sich jedoch nur nutzen, wenn die Effizienzen der Reaktionen ähnlich genug sind. Um dies zu überprüfen, wurde für alle zu untersuchenden Gene eine Effizienzvalidierung durchgeführt, in dem die Reaktionen über mehrere Verdünnungsstufen hinweg verglichen werden (*Template*: 100 - 2 ng Gesamt-RNA), wobei folgende Gleichung angewendet wird

$$C_T\text{-Wert}_{\text{untersuchtes Gen}} - C_T\text{-Wert}_{\text{endogene Kontrolle}} = \Delta C_T \text{ Verdünnungsstufe } a$$

Die dabei gewonnenen ΔC_T -Werte werden in einem Graphen gegen die Verdünnungsstufen aufgetragen und eine Regressionsgerade gebildet. Die Steigung dieser Regressionsgeraden darf den Wert 0,1 nicht überschreiten, dann gelten die PCR-Effizienzen als hinreichend gleich (Livak & Schmittgen, 2001).

Steigungen der Regressionsgeraden

Gen	IE1	IE2	UL112/113	UL97	UL54	UL44	UL4	US11
Steigung	0,02	0,08	0,5	0,02	0,07	0,1	0,2	0,04

Für die Gene UL112/113 und UL4 waren die Voraussetzungen zur Anwendung der komparativen Methode nicht erfüllt. Daher wurde die Quantifizierung dieser Gene mit Hilfe relativer Standardkurven durchgeführt (siehe 2.6.12).

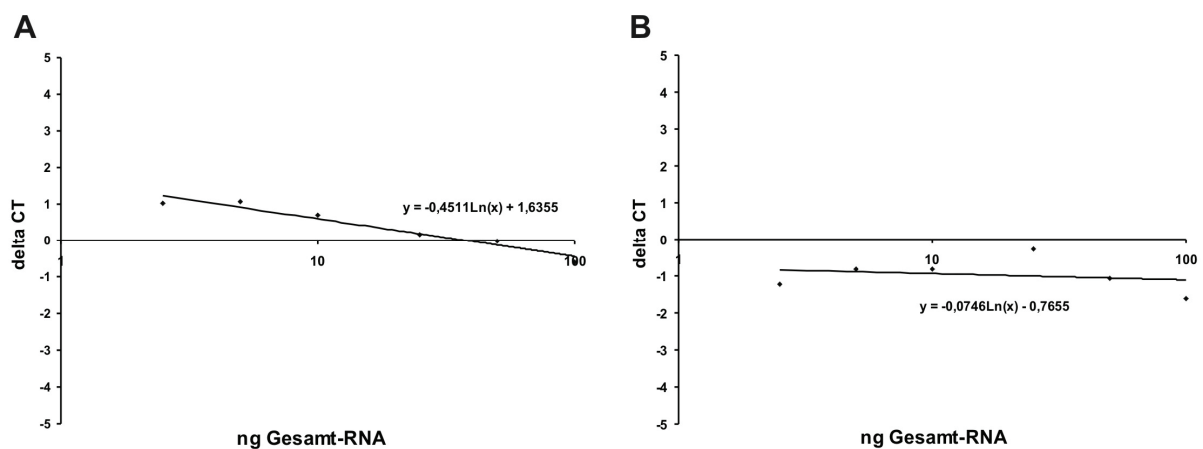


Abb. 3.21:

Darstellung der Ergebnisse der Effizienzvalidierung für die Gene UL112/113 und UL54. Die Beträge der Steigungen der Regressionsgeraden sind verschieden, für UL112/113 ist dieser größer, für UL54 kleiner als 0,1. Daher kann die komparative Methode nicht auf UL112/113 angewandt werden. **A)** Effizienzvalidierung für das Gen UL 54 **B)** Effizienzvalidierung für das Gen UL112/113

Relative Quantifizierung viraler Transkripte mit relativen Standardkurven

Diese Methode ermöglicht die relative Quantifizierung auch dann, wenn die Effizienzen der Reaktionen die Bedingungen der Effizienzvalidierung nicht erfüllen und die komparative Methode nicht angewendet werden kann (Programme und PCR-Ansatz siehe oben). Im Gegensatz zur absoluten Quantifizierung werden jedoch keine Standards mit bekannten Kopiezahlen der untersuchten Transkripte verwendet. Zur Herstellung der Standardreihe kann ein beliebiges Gemisch an RNAs verwendet werden, welches das zu untersuchende Transkript enthält, dabei kann es sich z. B. um isolierte Gesamt-RNA aus infizierten Zellen zur Untersuchung eines viralen Transkripts handeln. Es wurde eine Verdünnungsreihe mit bekannten Mengen an Gesamt-RNA hergestellt, mit deren Hilfe die verschiedenen zu untersuchenden Proben verglichen wurden. Da es sich um eine relative Quantifizierungsmethode handelt, muss auch hier eine endogene

Kontrolle verwendet werden, die auch eine eigene Standardreihe benötigt. Die C_T -Werte der zu messenden Proben wurden über die Standardreihen der endogenen Kontrolle und des zu untersuchenden Gens in die entsprechenden RNA-Mengen umgerechnet und die ermittelten Werte auf die endogene Kontrolle normiert. Anschließend wurden die normierten RNA-Mengen durch Division mit dem Kalibrator verglichen und somit die relative Quantität bestimmt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Umrechnung mit Hilfe der Systemsoftware des ABIPrism™ 7500 durchgeführt.

Fehlerfortpflanzung:

Zur Bestimmung der Standardabweichung der Größe RQ gelten folgende Gleichungen:

$$cv = \frac{s}{\bar{X}}$$

$$cv_N = \sqrt{cv_{Gen}^2 + cv_{endogene\ Kontrolle}^2}$$

$$cv_{RQ} = cv_N$$

S	=	Standardabweichung RNA-Menge
\bar{X}	=	Mittelwert RNA-Menge
cv_N	=	cv Normalisiert
cv_{RQ}	=	cv Relative Quantität

Herstellung von *Real-Time* RT-PCR Standardreihen

Die Technik der *in-vitro* Transkription ermöglicht die Herstellung von RNA Molekülen außerhalb des Zellsystems mit Hilfe viraler RNA-Polymerasen. Zur Herstellung von RNA-Standards für die Quantifizierung von IE1- und IE2-Transkripten mit Hilfe der *Real-Time* RT-PCR wurde das Megascript™ T7 Kit (Ambion, TX, USA) eingesetzt. Dazu wurden die Vektoren pT7IE1 (IE1) und pHM120 (IE2), die die cDNA des jeweiligen Transkripts unter der Kontrolle des T7 Promotors enthielten, verwendet. Um die Länge der entstehenden RNA-Transkripte zu beschränken, wurden die verwendeten Plasmide 3' zur klonierten cDNA mit einem geeigneten Restriktionsenzym geschnitten. Die Plasmide wurden dabei mit einer Endonuklease linearisiert, die keine 3'-Überhänge generiert. Dadurch sollte ein unerwünschtes Priming der RNA-Synthese durch 3'-Überhänge an der Schnittstelle in

Anti-sense Richtung ausgeschlossen werden (Schendorn & Mierendorf, 1985). Linearisierter Vektor (1 µg) wurde mit 2 µl Enzym-Mix, je 2 µl NTP-Lösung für ATP, CTP, GTP und UTP, und 2 µl 10x Reaktionspuffer in einem Endvolumen von 20 µl für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die *in-vitro* Transkripte mit Hilfe des RNeasy Kits (+ DNase I Verdau, Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Nach Bestimmung der RNA-Ausbeute wurde die Zahl an vorhandenen Transkripten mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Teilchenmenge [Transkripte/}\mu\text{l]} = \frac{6 \times 10^{23} \text{ [Kopien / mol]} \times \text{Konzentration [g/}\mu\text{l]}}{\text{MW [g/mol]}}$$

Konzentration: RNA Konzentration in g/µl

MW für ssRNA: Größe des *in-vitro* Transkripts [Basen] x 340 Dalton/Base

Es wurden serielle Verdünnungsreihen der *in-vitro* Transkripte in nukleasefreiem Wasser hergestellt (1×10^1 - 1×10^6 Kopien/µl) und als Standard in die RT-PCR eingesetzt.

2.6.14. Southern Blot

Eine Methode zur Analyse von DNA-Fragmenten stellt der Southern Blot dar. Mit Hilfe dieser Technologie ist es möglich, einzelne DNA-Fragmente in einem Gemisch (z. B. auf einem Agarosegel) zu identifizieren. Das Prinzip des Southern Blots beruht auf der Fähigkeit zur Selbstorganisation von doppelsträngigen DNA Molekülen. Denaturiert man ein DNA-Molekül, trennt es sich in seine beiden Einzelstränge auf. Unter nicht denaturierenden Bedingungen reassoziieren diese Stränge wieder zu einem Doppelstrang (Hybridisierung). Wird nun ein DNA-Molekül chemisch oder radioaktiv markiert (Sonde), denaturiert und zu dissoziierten DNA-Molekülen gegeben, wird es auch mit anderen DNA-Molekülen hybridisieren, wenn diese eine ausreichende Sequenzhomologie zu diesem markierten DNA-Molekül besitzen. In einem Gemisch von Molekülen lassen sich also diejenigen identifizieren, die eine komplementäre Sequenz zur verwendeten Sonde besitzen. Um die zu untersuchenden Moleküle leichter bearbeiten und identifizieren zu können, werden diese zunächst mit Hilfe der Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt und anschließend mit der von E. M. Southern beschriebenen Methode auf eine feste Matrix übertragen (Nylon- oder Nitrocellulose-Membran). Dort gebunden, werden die DNA-Moleküle denaturiert, mit der Sonde inkubiert und danach wieder renaturiert. Befindet sich dabei auf der Matrix ein Molekül mit einer zur Sonde komplementären Sequenz, wird sich ein Hybrid aus Sonde

und Zielsequenz bilden, das, je nach Sonden-Markierung, mit verschiedenen Systemen detektiert werden kann (Southern, 1975).

Southern Blot durch Kapillartransfer

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Southern Blots mit DIG-11-dUTP (Roche, Mannheim) markierten DNA-Sonden nach Angaben des Roche „*DIG Application Manual for Filter Hybridization*“ durchgeführt.

Zur Durchführung eines Southern Blots wurden die zu untersuchenden DNA-Moleküle zunächst mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, fotografiert und das Gel anschließend geblottet. Dazu wurde das Gel zur Depurinierung (bei Fragmenten ≥ 5 kb) 10 min in Blot I Lsg. (250 mM HCl) geschwenkt und kurz mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gespült. Darauf folgten 15 min in Blot II Lsg. (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) zur Denaturierung der DNA. Anschließend wurde das Gel für 2x 15 min in Blot III Lsg. (0,5 M TRIS-HCl, 1,5 M NaCl, pH-Wert 7,5) neutralisiert. Danach folgen 10 min Inkubation in 20x SSC (3 M NaCl 0,3 M Na-Citrat pH 7,0).

Der Kapillartransfer der DNA auf die Nylonmembran (Roche, Mannheim) wurde in 20x SSC über Nacht mit einer Pufferbrücke oder als *dry blot* ohne Pufferbrücke durchgeführt und die DNA anschließend mittels *UV-crosslinking* mit $0,15 \text{ J/cm}^2$ kovalent an eine positiv geladene Nylonmembran gebunden. Die Hybridisierung mit den denaturierten Sondenmolekülen (10 min 100°C , 5 min auf Eis) erfolgte standardmäßig bei einer Temperatur von 40°C für 16 h in Church-Puffer. Abweichende Hybridisierungstemperaturen wurden nach folgender Formel berechnet (für Sonden mit 80 – 100% Homologie):

$$T_{\text{Hyb}} = T_m - 25^\circ\text{C}$$

$$T_m = (16,6 \log [\text{Mol Na}^+] + [0,41 \times (\% \text{ G+C})] + 81,5) - (0,72^\circ\text{C} \times \% \text{ Formamid})$$

Mol Na^+ = molare Konzentration der Natriumionen im Hybridisierungspuffer

% G+C = Anteil der Basen Guanin und Cytosin an der Sondensequenz

% Formamid = Prozentualer Anteil von Formamid im Hybridisierungspuffer

Zur Detektion der hybridisierten Moleküle wurden gegen Digoxigenin gerichtete monoklonale Antikörper verwendet, die kovalent mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt waren. Als Substrat für die alkalische Phosphatase wurde die

chemilumineszente Verbindung CSPD (Roche, Mannheim) eingesetzt. Nach erfolgter Hybridisierung wurden die Membranen zunächst 2x 15 min in Wash I Puffer (2x SSC, 0,1% SDS) bei RT geschwenkt, um ungebundene Sonde zu entfernen, dann unter stringenten Bedingungen 3x 15 min bei 65°C in Wash II (0,5x SSC, 0,1% SDS) gewaschen und anschließend für 5 min in Wash III (100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,5 und 3 ml/l Tween 20) equilibriert. Danach wurde die Membran unter starkem Schütteln für mind. 1 h bei RT geblockt (10% Blockingreagenz Roche, Mannheim, in 100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,5). Daran schloss sich eine Inkubation mit Anti-DIG-Fab Fragmenten (Roche, Mannheim) für 30 min bei RT an. Nach 3x 15 min in Wash III (bei RT) wurde die Membran für 5 min in Detektionspuffer (50 mM TRIS-HCl, 50 mM NaCl, pH 9,5) equilibriert und anschließend mit 10 ml CSPD-Lsg. (CSPD 1:100 in Detektionspuffer) für 5 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Danach wurde die Substratlösung entfernt und die Membran nochmals für 15 min bei 37°C im Dunkeln entwickelt. Hybridisierungssignale wurden in der Folge mittels Chemilumineszens anhand der Schwärzung eines Biomax Röntgenfilms (Kodak, Sigma, Deisenhofen) detektiert.

2.6.15. Northern Blot

Northern Blot Analysen wurden mit Digoxigenin markierten DNA- und RNA-Sonden nach Angaben des Roche „DIG Application Manual for Filter Hybridization“ durchgeführt (siehe auch 2.6.14). Dabei wurde bei Verwendung von DNA-Sonden mit 50°C, und bei Verwendung von RNA-Sonden mit 68°C in Church-Puffer hybridisiert. Alle Lösungen wurden zur Inaktivierung von RNAsen entweder direkt mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt (mind. 30 min bei RT rühren, Autoklavieren) oder mit DEPC-behandeltem Wasser angesetzt. Wie bei Southern Blot Analysen wurden RNA-Gele nach dem Prinzip des Kapillartransfers geblottet (Durchführung siehe 2.6.14), mit dem Unterschied, dass für RNA-Moleküle keine Depurinierung notwendig war.

2.6.16. Markierung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren können auf vielfältige Weise zur Herstellung von Sonden für Southern und Northern Blotting markiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle verwendeten Sonden nicht-radioaktiv markiert, wobei DIG-11-dUTP (Roche, Mannheim) für DNA-Sonden und DIG-11-UTP für RNA-Sonden eingesetzt wurden. Dabei handelt es sich um chemisch modifizierte Uridin- bzw. Desoxyuridintriphosphate, die ein kovalent gebundenes Digoxigeninmolekül tragen. Digoxigenin ist immunogen und kann daher von

monoklonalen Antikörpern detektiert werden. Es markiert somit im Blot das gesuchte DNA- oder RNA-Fragment.

Markierung von DNA

Zur Herstellung von digoxigenin-markierten doppelsträngigen DNA-Sonden wurde das PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche, Mannheim) verwendet. 10-100 pg Plasmid DNA wurden nach Angaben des Herstellers in die PCR-Reaktionen eingesetzt und die Produkte anschließend mit Hilfe des Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Der erfolgreiche Einbau von DIG-11-dUTP wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese anhand der veränderten Laufgeschwindigkeit des PCR-Produkts verifiziert.

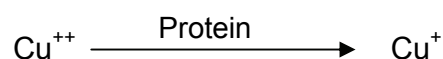
Markierung von RNA

Die Technik der *in-vitro* Transkription ermöglicht die zellfreie Synthese von RNA Molekülen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden DIG-markierte *in-vitro* Transkripte als ssRNA-Sonden verwendet. Die Digoxigenin-UTP (Roche, Mannheim) markierten einzelsträngigen RNA-Sonden wurden mit Hilfe des „SP6/T7 RiboProbe® In Vitro Transcription System“ (Promega, WI, USA) hergestellt. Die RNA-Sonden wurden dabei während der *in-vitro* Transkription durch den Einbau von Digoxigenin-UTP markiert. Die Markierungsreaktion wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt und der erfolgreiche Einbau anhand des veränderten Laufverhaltens des Transkripts auf einem denaturierenden Agarosegel kontrolliert.

2.7. Analyse von Proteinen

2.7.1. Quantitative Bestimmung der Proteinmenge

Zur Bestimmung der Proteinmenge in Lösungen wurde das BCA-Assay Kit (Pierce, IL, USA) verwendet. Der Nachweis basiert dabei auf der Biuret-Reaktion:



Die entstehenden Cu^{+} -Ionen bilden mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex, dessen Absorption bei 540 nm mit Hilfe eines Photometers quantifiziert werden kann. Die Proteinbestimmung wurde nach Angaben des Herstellers im 96-Well Format mit 5 μl Proteinlösung durchgeführt.

2.7.2. Verwendete Antikörper

Primäre Antikörper

Spezifität	Bezeichnung	Modifikationen	Herkunft	Hersteller	Verdünnung	
					WB	IF
FlagTag	M2 (F3165)	-	Maus	Sigma (München)	1:5000	1:490
IE1	Klon p63-27	-	Maus	(Andreoni <i>et al.</i> , 1989)	1:1000	unv
IE2	SMX	-	Maus	(Plachter <i>et al.</i> , 1993)	unv	unv
Tubulin	ab3194	-	Maus	abcam (Cambridge, UK)	1:2000	-

Sekundäre Antikörper

Spezifität	Modifikationen	Herkunft	Hersteller	Verdünnung	
				WB	IF
Maus IgG, IgM und IgA	FITC	Kaninchen	DAKO (Hamburg)	-	1:50
Maus IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA und IGM	Horse Radish Peroxidase (HRP)	Kaninchen		1:10.000	-

2.7.3. Indirekte Immunfluoreszenz

Die indirekte Immunfluoreszenz (IF) ermöglicht die mikroskopische Detektion von Proteinen in Zellen mit Hilfe spezifischer Antikörper. Dazu wurden Zellen auf acetonbehandelten Deckgläschen ausgesät und anschließend mit dem zu untersuchenden Expressionsvektor bzw. Virus transfiziert bzw. infiziert. Die Zellen auf den Deckgläschen wurden mit 1x PBS gewaschen und mit 90% Aceton in 24-Well Platten für 20 min bei RT oder über Nacht bei 4°C fixiert. Danach wurden die Zellen 2x mit 0,1% Triton in PBS gewaschen und mit einem spezifischen Antikörper (Primärer Antikörper) 1 h bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit 0,1% Triton in PBS wurden die Deckgläschen mit einem FITC gekoppelten Sekundärantikörper für 1 h bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert, wobei zur Kontrastfärbung 1:50 verdünntes Evans Blau zugesetzt wurde. Anschließend

wurden die Ansätze 2x mit 0,1% Triton und 1x mit H₂O_{dest} gewaschen und auf Objektträgern mit Mountingmittel zur Fluoreszenzverstärkung eingedeckt. Die Präparate wurden zur Analyse mit UV-Licht (470-500 nm) angeregt und mit Hilfe einer Digitalkamera fotografiert.

2.7.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Reagenzien:

2x SDS-Auftragspuffer	100 mM TRIS-HCl (pH 6,8), 4% SDS, 0,2% Bromphenolblau, 20% Glycerin, 100 mM DTT
Sammelgelpuffer	1,5 M TRIS-HCl (pH 6,8)
Trenngelpuffer	1,0 M TRIS-HCl (pH 8,8)
5x Laufpuffer	25 mM TRIS-Base, 192 mM Glycin, 0,1% SDS, pH 8,9

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen, wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit einem SDS-Puffersystem verwendet (LAEMMLI, 1970). Die negativ geladenen SDS-Ionen lagern sich hierbei in einem konstanten Verhältnis von 1,4 g SDS pro g Protein an die denaturierten Proteine an und überdecken damit wirksam deren Eigenladung. Die Proteinauftrennung im Gel erfolgt daher ausschließlich nach dem Molekulargewicht. Im Sammelgel werden dabei die aufzutrennenden Proteine zunächst durch den entstehenden Feldstärkegradienten zwischen den im Puffer enthaltenen Chlorid- und Glycinionen ihrer Mobilität nach „gestapelt“ (Stacking-Effekt) und aufkonzentriert. Im Trenngel werden die Proteine anschließend durch die Porengröße der Gelmatrix nach ihrem Stokeschen-Radius aufgetrennt. Je nach Molekulargewicht des untersuchten Proteins wurden dabei Trenngele mit Acrylamidkonzentrationen zwischen 5 und 15 % verwendet. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend im Western Blot zur spezifischen Detektion einzelner Proteine weiter bearbeitet.

2.7.5. Western Blot

Reagenzien:

Transferpuffer	25 mM TRIS-Base, 192 mM Glycin, 20% Methanol
PBS-Tween	1x PBS + 0,1% (v/v) Tween-20

Um Proteine spezifisch nachzuweisen, wurden Western- oder Immunoblots im „*semi-dry*“ Verfahren (Kyhse-Andersen, 1984) durchgeführt. Dabei wurden die Proteine nach der Auftrennung durch SDS-PAGE auf eine PolyScreen™-Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membran (Perkin-Elmer, Zaventem, Belgien) überführt. Nach einer Inkubation der Membran in Methanol (5 min, RT) und kurzem Benetzen der Membran mit Transferpuffer, wurden Gel und Membran zwischen je drei Lagen mit Transferpuffer getränktem Whatmanpapier 3 MM in der Blotapparatur platziert und der Transfer mit 400 mA für 75 min durchgeführt (siehe Abb. 2.2). Die Membran wurde für 2 h mit Milchpulver geblockt (5% Milchpulver in PBS-Tween) und anschließend mit dem gewünschten Primärantikörper in PBS-Tween + 5% Milchpulver über Nacht bei 4°C inkubiert. Unspezifisch gebundener Antikörper wurde mit PBS-Tween (4x 15 min bei RT) entfernt und die Membran anschließend nach Zugabe von *HRP*-gekoppelten Sekundärantikörpern (in 1x PBS) für 1 h geschüttelt. Nach erneutem Waschen mit PBS-Tween (4x 15 min bei RT) und 1x PBS (1x 10 min bei RT) wurden die gebundenen Sekundärantikörper durch Inkubation mit ECL-Plus (Amersham Biosciences, Freiburg) anhand von Chemilumineszenz mit einem Biomax Röntgenfilm (Kodak, Sigma, Deisenhofen) detektiert.

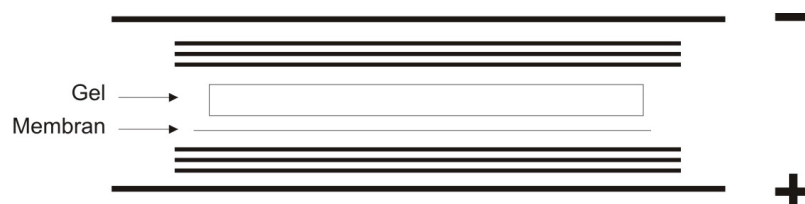


Abb. 2.2:

Schematischer Aufbau eines „*semi-dry*“ Blots in einem Elektroblotter. Die Elektroden sind entsprechend ihrer Ladung gekennzeichnet.

3. Ergebnisse

Alle Ergebnisse werden im Folgenden, wenn nicht anderweitig angegeben, anhand eines repräsentativen Experiments dargestellt, das mindestens zweimal reproduziert werden konnte.

3.1. Analyse möglicher offener Leserahmen im IE4 Bereich

3.1.1. Northern Blot Analyse der IE4 Genregion

Zu Beginn dieser Arbeit war die Bedeutung der IE4 Genregion für die Replikation von HCMV weitgehend unklar. Vorarbeiten in unserem Labor hatten Hinweise ergeben, dass die Deletion der Region im Genom von HCMV zu Beeinträchtigung der frühen viralen Genexpression führt (Pepperl, 2000). In einem ersten Abschnitt sollte daher geprüft werden, ob von dieser Genomregion weitere Transkripte abgelesen wurden, die, anders als die bislang bekannten RNAs für ein größeres Polypeptid kodieren konnten. Hierzu wurden Northern Blot Analysen durchgeführt. HFF wurden mit dem Wildtypstamm Ad169 des HCMV infiziert. Nach einer Infektion von 5 Tagen wurden die Zellen gewonnen und die gesamtzelluläre RNA (Gesamt-RNA) isoliert. Diese Gesamt-RNA wurde anschließend mittels denaturierender Gelelektrophorese für mindestens 28 h aufgetrennt, geblottet und mit verschiedenen DNA-Sonden aus der IE4-Region hybridisiert. Die Sonden wurden in einer Weise ausgewählt, die sicherstellte, dass die gesamte IE4-Region abgedeckt wurde.

In einer ersten Serie von Northern Blot Analysen wurde zunächst mit der Sonde #5 hybridisiert. Diese Sonde deckt einen großen zentralen Bereich der IE4-Region ab. Ziel war eine zunächst orientierende Analyse der Transkription in dieser Region. Dabei wurden ribosomale RNA aus *E. coli* und Gesamt-RNA aus mock-infizierten HFF als Negativkontrollen verwendet. Abb. 3.1 zeigt ein repräsentatives Northern Blot Experiment mit Sonde #5. Das weitaus stärkste Hybridisierungssignal wurde einer RNA von etwa 5,3 kb zugeordnet (5 kb RNA, (Jahn *et al.*, 1984)). Diese RNA entspricht offensichtlich dem von anderen beschriebenen stabilen Intron (Kulesza & Shenk, 2004). Überraschender Weise konnten darüber hinaus aber weitere Transkripte von 4,7 kb, 4,2 kb, 3,9 kb und 0,9 kb nachgewiesen werden. Allerdings war die Stärke des Hybridisierungssignals, verglichen mit der Hauptbande der 5 kb RNA in allen Fällen deutlich schwächer.

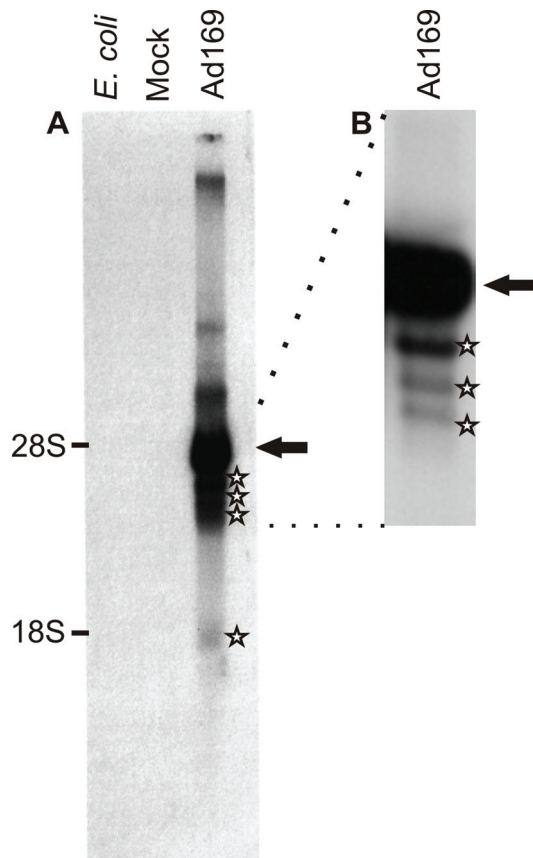
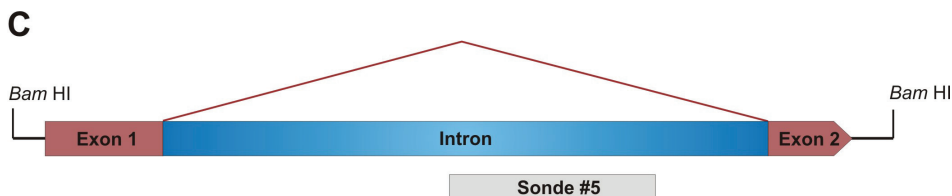


Abb. 3.1:

Nachweis neuer IE4-Transkripte im Northern Blot. Gesamt-RNA aus infizierten HFF (5 d p.i.) wurde 28 h in der denaturierenden Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend mit Sonde #5 hybridisiert. Zum Größenvergleich wurden die Positionen der 28S (4718 nt) und 18S (1874 nt) ribosomalen RNAs (rRNA) markiert.

A) Northern Blot mit 10 µg Gesamt-RNA aus infizierten HFF (10 min belichtet). Sterne markieren neue unbekannte Fragmente, schwarze Pfeile markieren das Signal der 5 kb RNA. **B)** Northern Blot mit 5 µg Gesamt-RNA aus infizierten HFF und mit kürzerer Belichtungszeit (5 min belichtet). Der Bereich der 5 kb RNA wurde vergrößert dargestellt. **C)** Position der verwendeten DNA Sonde #5 in der IE4 Genregion.



Laufstrecke in cm	Größe in kb	
5,4	5,3	5 kb RNA
5,7	4,7	Unbekannt
6,0	4,2	Unbekannt
6,2	3,9	Unbekannt
10,0	0,9	Unbekannt

Tab. 3.1:

Zusammenstellung der gemessenen Laufstrecken der Transkripte aus dem Northern Blot und ihrer daraus ermittelten Größe.

Bestimmung der Transkriptionsrichtung

Da die in Abb. 3.1 dargestellten „neuen“ Transkripte bislang nicht näher beschrieben waren, sollte in einem zweiten Schritt die jeweilige Transkriptionsrichtung bestimmt werden. Hierzu wurden strang-spezifische RNA-Sonden durch *in-vitro* Transkription der Sonde #5 hergestellt und im Northern Blot verwendet. Zunächst wurde das DNA-Fragment, das der Sonde #5 entsprach durch PCR amplifiziert und in beiden Orientierungen in den Vektor pBluescript kloniert. Die Herstellung der einzelsträngigen RNA-Sonden erfolgte mit Hilfe eines T7-*In-vitro* Transkriptionssystems unter Zugabe von DIG-11-UTP. Die Sonden wurden in der Folge zur Northern Blot Analyse wie oben beschrieben eingesetzt. Wie in Abb. 3.2 dargestellt, konnten ausschließlich mit der Sonde, die in Gegenrichtung (*anti-sense*) zur 5 kb RNA orientiert war, spezifische Hybridisierungssignale erhalten werden. Das Hybridisierungsmuster entsprach hierbei dem der DNA-Sonde. Mit der gleich orientierten RNA-Sonde (*sense*) wurde sowohl in der RNA Präparation aus infizierten wie auch aus uninfizierten Zellen ein relativ zur spezifischen Hybridisierung schwaches Signal erhalten. Dieses Signal wird durch eine Kreuzhybridisierung von HCMV-Sequenzen der IE4-Region mit ribosomaler RNA verursacht, wie sie aus der Literatur bekannt ist (Shaw *et al.*, 1985). Zusammengefasst

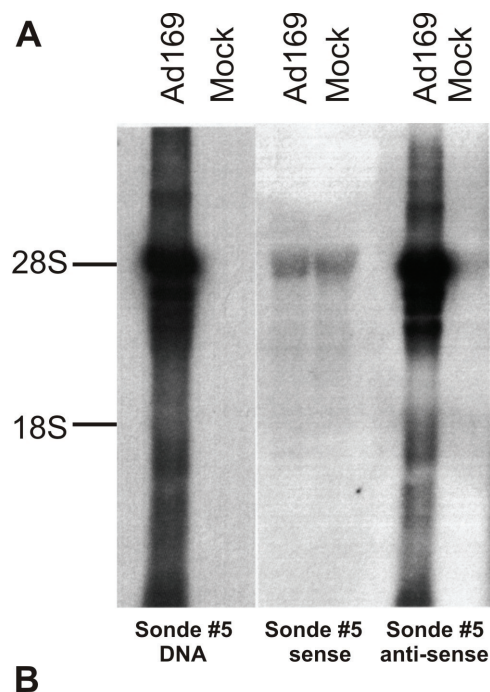


Abb. 3.2:

Bestimmung der Transkriptionsrichtung der unbekanntenen IE4-Transkripte. **A**) Northern Blot mit 10 µg Gesamt-RNA aus infizierten HFF (5 d p.i.). Zur Hybridisierung wurde die Sonde #5 als doppelsträngige DNA- und einzelsträngige RNA-Sonde eingesetzt. Die Bezeichnungen *sense* und *anti-sense* stehen für die jeweilige Transkriptionsrichtung der RNA-Sonde im Bezug auf die Transkriptionsrichtung der von (Jahn *et al.*, 1984) beschriebenen RNA im IE4-Bereich. Als Größenstandard wurden die Positionen der 28S (4718 nt) und 18S (1874 nt) rRNAs markiert. **B**) Position und Orientierung der verwendeten DNA- und RNA-Sonden.

zeigten diese Ergebnisse, dass von der IE4-Region des HCMV zusätzlich zu der dominanten RNA von 5 kb weitere, weniger abundante RNAs kodiert werden.

3.1.2. Strukturelle Analyse der IE4-Transkripte mittels cDNA-Synthese

Durch die Northern Blot Analysen wurden verschiedene, bislang nicht beschriebene RNAs nachgewiesen, deren Strukturen im Folgenden durch cDNA Synthese und anschließende Sequenzierung genauer untersucht werden sollten. Zur Klonierung der cDNAs wurden Primer ausgewählt, die entweder den gesamten IE4 Bereich überspannten oder den Bereich von Sonde #5 bis einschließlich Exon 2 enthielten (siehe Abb. 3.3). Die Auswahl der Primerpaare sollte sicherstellen, dass neben dem bereits von Rawlinson und Barrell (1993) beschriebenen Spleißprodukt mögliche weitere RNAs erfasst wurden.

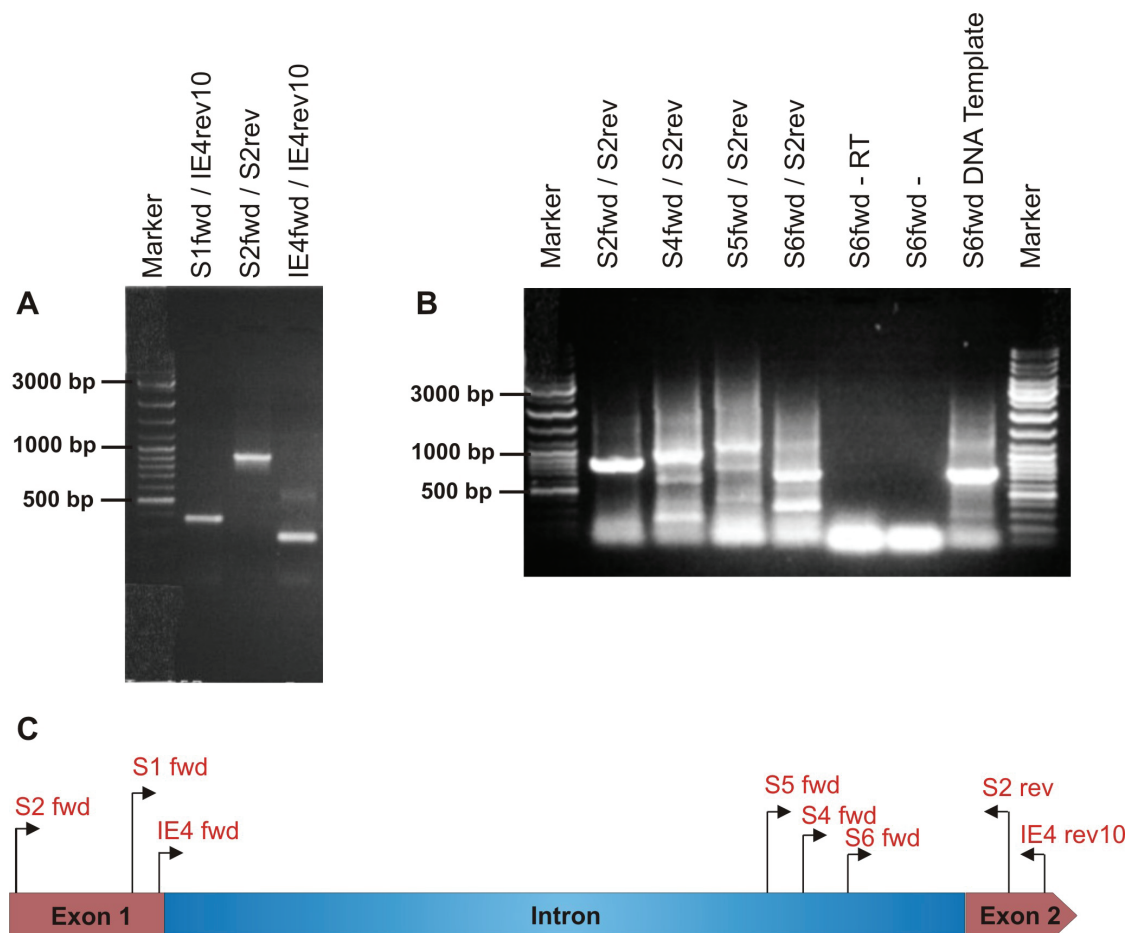


Abb. 3.3:

Herstellung von cDNAs aus den Transkripten des IE4-Bereichs. Gesamt-RNA (1 µg) aus infizierten HFF (MOI 1, 5 d p.i.) wurde in eine RT-PCR eingesetzt. Die jeweils eingesetzten Primerpaare sind angezeigt. **A**) Produkte einer RT-PCR mit Primerpaaren, die den gesamten IE4-Bereich überspannen. **B**) Produkte einer RT-PCR mit Primerpaaren, die den zentralen Bereich des Introns bis einschließlich Exon 2 überspannen. **C**) Positionen der zur cDNA-Synthese eingesetzten Primer im IE4-Bereich

Wie in Abb. 3.3 dargestellt, konnte mit den Primerpaaren S1fwd/IE4rev10, S2fwd/S2rev und IE4fwd/IE4rev10, die den gesamten IE4-Bereich überspannten, nur je ein Produkt gefunden werden. Die Größe dieser cDNA stimmte mit der Größe einer RNA überein, die durch den bereits von Rawlinson und Barrell (1993) beschriebenen Spleißvorgang entsteht (1,1 kb RNA). Die Primerpaare, welche den zentralen Bereich des Introns bis Ende des Exons 2 überspannten, produzierten wider erwarten mehrere cDNAs unterschiedlicher Größe. Dieses Ergebnis deutete auf alternative Spleißvorgänge des Primärtranskripts hin. Die im Vergleich zur DNA-Sequenz verkürzten cDNAs wurden aus dem Gel eluiert und in den pKAR-Vektor kloniert. Die so erhaltenen cDNA-Klone wurden anschließend sequenziert und mit der IE4-DNA Sequenz verglichen. Es konnten hierbei neue Spleißprodukte identifiziert werden, die sich von der bereits beschriebenen Variante (Rawlinson & Barrell, 1993) unterschieden. Die drei dabei identifizierten Spleißvarianten unterschieden sich jeweils in der verwendeten 3'-Prozessierungsstelle (Spleiß-Donor). Alle Klone wiesen aber den gleichen 5'-Übergang (Spleiß-Akzeptor) auf. Dieser Spleiß-Akzeptor entsprach der für die Prozessierung des Haupttranskripts genutzten Spaltstelle (Abb. 3.4). Die Spleiß-Donoren zeigten alle das für den Spleißvorgang notwendige GT-Motiv, unterschieden sich in ihren flankierenden Sequenzen jedoch mehr oder weniger stark von der Konsensussequenz für Spleiß-Donoren in eukaryontischen und viralen Systemen (Flint *et al.*, 2004).

cDNA Klon	Sequenz	Position im HCMV-Genom
1,1 kb RNA	GTAGGTG	159626-159634
S4-14	ATAGGTT	155375-155382
S6-6	ACAAGTA	155506-155511
S5-19	ATCAGTG	155916-155921
Konsensussequenz	RAGGTR	-

Tab. 3.2:

Sequenzen der Spleiß-Donoren im IE4-Bereich. Der Farbwechsel markiert die Spleißstelle, grüne Basen sind Bestandteil des ersten Exons, rote Basen sind Bestandteil der Intronsequenz. Die angegebenen Positionen beziehen sich auf die von Chee *et al.* (1990) veröffentlichte HCMV-Sequenz (NCBI Referenznummer: X17403). Angegebene Konsensussequenz wurde modifiziert nach (Flint *et al.*, 2004).

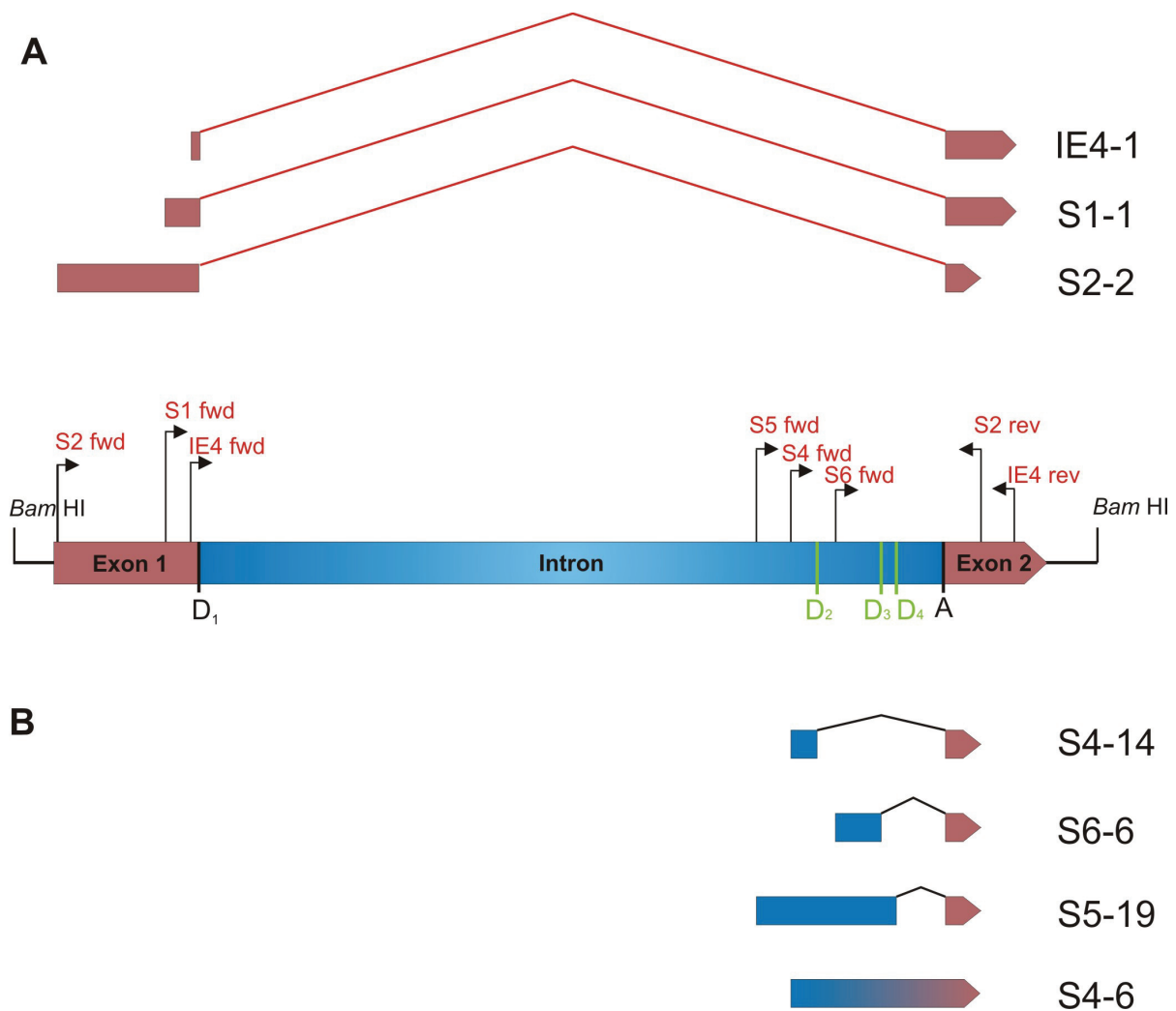


Abb. 3.4:

Identifizierung alternativer Spleißdonoren im IE4-Bereich. Gesamt-RNA aus infizierten HFF wurde in RT-PCRs mit den jeweils (in Rot) gezeigten Primern eingesetzt und die Sequenzen der cDNA-Klone mit der Sequenz des IE4-Bereichs verglichen. Neu entdeckte putative Spleißdonoren sind in Grün markiert (D_{2-4}). Der Donor „ D_1 “ und der Akzeptor „ A “ wurden bereits von Rawlinson und Barrel (1993) beschrieben und führen zur Bildung der 1,1 kb RNA. Zum Vergleich: Der Klon S4-6 enthielt ein Fragment der mit DNA-*Template* erwarteten Größe. In diesem Klon konnte wie erwartet kein Spleißvorgang nachgewiesen werden. **A**) Ergebnisse des Sequenzvergleichs der cDNAs mit den Primerpaaren, die den gesamten IE4-Bereich überspannen. Diese cDNAs entstanden aus RNA-*Templates* zu deren Prozessierung der von Rawlinson beschriebene Spleiß-Donor D_1 genutzt wurde. **B**) Ergebnisse des Sequenzvergleichs der cDNAs mit Primerpaaren die den Bereich von Sonde #5 bis Exon 2 einschließen. Die RNA-*Templates* dieser cDNAs entstanden durch die Nutzung der bisher noch nicht beschriebenen alternativen Spleiß-Donoren D_{2-4} .

Die Sequenzen der cDNA-Klone wurden hinsichtlich möglicher proteinkodierender Sequenzen (offene Leserahmen, ORFs) analysiert. In Tabelle 3.2 wurden die Eigenschaften der gefundenen ORFs zusammengefasst. Dabei wurden nur ORFs berücksichtigt, die durch die neu entdeckten Spleißvorgänge entstanden sind. In zwei der drei dargestellten Klone konnten ORFs identifiziert werden, die deutlich größer als

der ursprünglich beschriebene offene Leserahmen von 31 aa sind, wobei nur zwei dieser drei offenen Leserahmen über ein Startcodon verfügen.

cDNA-Klon	Leseraster	Länge in Aminosäuren	ATG vorhanden
cDNA S5-19	1	53	-
	2	53	-
	3	32	-
cDNA S6-6	1	34	-
	2	87	-
	3	100	ATG
cDNA S4-14	1	61	ATG
	2	27	-
	3	Stop-Codon	-

Tab. 3.3:

Auflistung aller möglichen offenen Leserahmen der untersuchten cDNA-Klone (siehe Abb. 3.4)

3.1.3. Eingrenzung der 5'-3'-Enden der alternativen IE4-Transkripte

Die bis zu diesem Punkt erhaltenen Ergebnisse ließen keine genaue Zuordnung zwischen den im Northern Blot mit Sonde #5 gefundenen Transkripte und der Struktur der klonierten cDNAs zu. Um festzustellen, welche Ausdehnung die neuen mit Sonde #5 nachgewiesenen IE4-Transkripte in 5'- und 3'-Richtung besaßen, wurden Northern Blot Analysen mit Sonden durchgeführt, die den gesamten IE4-Bereich abdeckten. Die Lage dieser Sonden im Bezug auf die HCMV-Sequenz ist in Abbildung 3.5 dargestellt. Neben der bekannten abundanten RNA von 5,3 kb wurden die neuen IE4-Transkripte von 4,7 kb, 4,2 kb und 3,9 kb von allen vier Intronsonden (Sonde #2, #3, #4 und #5) detektiert. Dies spricht dafür, dass diese RNAs weitgehend überlappende Sequenzen besitzen. Keine dieser RNAs hybridisierte jedoch mit den beiden Exonsonden IE4-1 und IE4-2. Diese Sonden detektierten aber beide das bekannte Spleiß-Produkt von 1,1 kb des IE4-Transkripts (Rawlinson & Barrell, 1993). Die unterschiedliche Hybridisierungsstärke der beiden Sonden lässt sich dadurch erklären, dass die Sonde IE4-1 auch mit der mRNA für das HCMV IL10 Homolog (cmvIL10, kodiert in UL111a, Orientierung in Gegenrichtung) hybridisiert. Diese RNA ist von ähnlicher Größe wie das dominante Spleiß-Produkt der IE4-Region. Alle Intronsonden wiesen im Bereich des 0,9 kb Transkripts (Abb. 3.1) ein identisches Hybridisierungsmuster auf. Da eine RNA

von 0,9 kb keine spezifische Hybridisierung mit allen Intronsonden gleichzeitig aufweisen kann, wurde daraus geschlossen, dass es sich bei dem Signal des 0,9 kb Transkripts um eine unspezifische Hintergrundhybridisierung handelte.

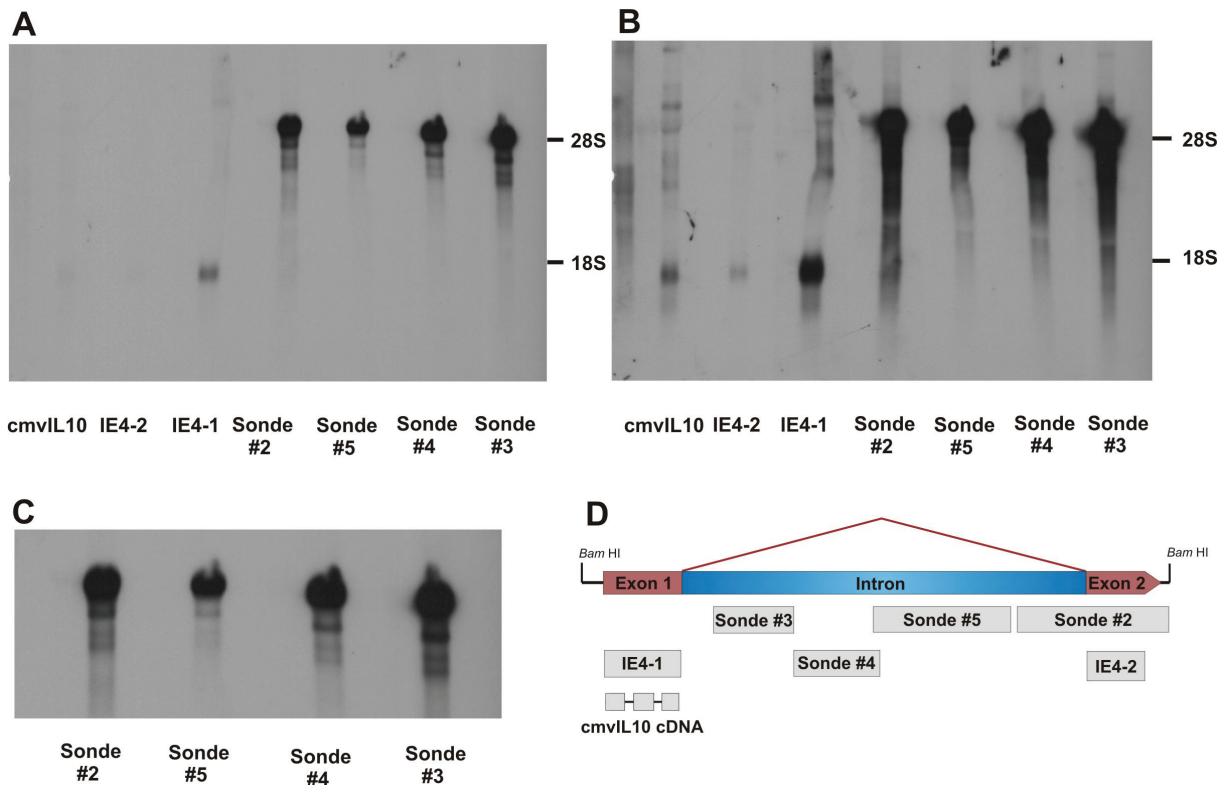


Abb. 3.5:

Northern Blot zur Eingrenzung der 5'-3'-Enden der neuen IE4-Transkripte. Es wurden 5 µg Gesamt-RNA aus mit Ad169 infizierten HFF (5 d p.i.) eingesetzt und mit den angegebenen Sonden hybridisiert. Nicht infizierte Zellen dienten als Mock-Kontrolle. Zum Größenvergleich wurden die Positionen der 28S (4718 nt) und 18S (1874 nt) rRNAs eingezeichnet. **A)** Northern Blot mit 2 min Belichtungszeit. **B)** Northern Blot mit 10 min Belichtungszeit. **C)** Vergrößerte Darstellung des Bereichs der IE4-RNAs des in A gezeigten Northern Blot. **D)** Schematische Darstellung der Positionen der verwendeten DNA-Sonden im IE4-Bereich.

Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse drei neue Transkripte im IE4-Bereich, die weit reichende Sequenzhomologien mit der 5 kb RNA aufwiesen und drei neue Spleiß-Donoren im 3'-Bereich der IE4-Intronsequenz, deren Nutzung eine mögliche Erklärung für die Entstehung dieser drei neuen Transkripte im IE4-Bereich (Abb. 3.1) bietet.

3.1.4. Identifikation eines möglichen Genproduktes mittels heterologer Expression des IE4-Bereichs

Herstellung eines IE4-FlagTag-Expressionsplasmids

Sowohl Northern Blot- wie auch cDNA- Analysen hatten nicht zur Identifizierung eines längeren ORF in der IE4 Region geführt. Es sollte daher über Klonierung des DNA-Abschnittes und nachfolgende transiente Transfektion untersucht werden, ob durch Prozessierungsvorgänge, die in den bisherigen Analysen möglicherweise nicht erfasst worden waren, doch eine funktionelle mRNA entstehen konnte. Um ein mögliches Protein nachweisen zu können, wurde die Erkennungssequenz für einen käuflichen monoklonalen Antikörper (FlagTag) in den Leserahmen inkliniert, der unmittelbar auf das von Rawlinson und Barrell (1993) beschriebene Kozak-ATG folgte. Die Struktur des durch PCR-Klonierung erhaltenen Plasmids ist in Abb. 3.6 dargestellt.

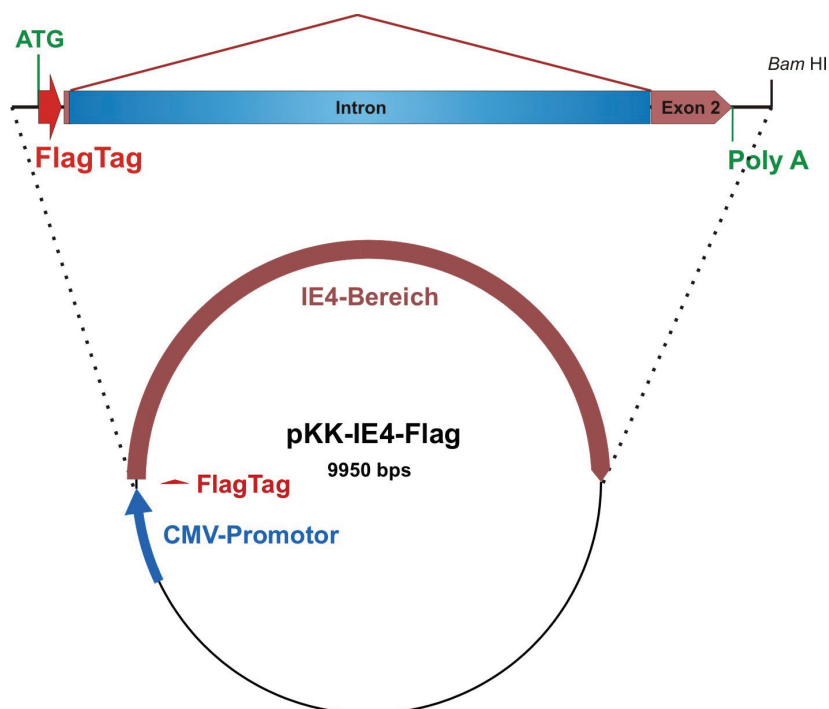


Abb. 3.6:

Vektorkarte des Expressionsplasmids pKK-IE4-Flag. Der IE4-Bereich ist vergrößert dargestellt. Das Erkennungsmotiv des FlagTag Antikörpers wurde in den 31aa großen ORF an die Position des von Rawlinson und Barrell (1993) beschriebenen Kozak-ATG inkliniert.

Northern Blot Analyse

Zur Analyse, ob das Plasmid pKK-IE4-Flag die aus infizierten Zellen bekannten RNAs exprimiert, wurden 3×10^5 293T Zellen mit Hilfe von Perfektin™ mit 2 µl des Konstrukts transformiert, 48 h später die Gesamt-RNA der Zellen isoliert und in einen Northern Blot eingesetzt. Als Transfektionskontrolle wurde das Expressionsplasmid pCNDAvIL10 verwendet, welches bekanntermaßen ein abundantes Transkript von etwa 1 kb exprimiert. Zum Nachweis der Expression wurden die Sonde #2 und #5 und markierte cmvIL10 cDNA eingesetzt. Gesamt-RNA aus Ad169-infizierten HFF wurde als Hybridisierungskontrolle verwendet. Die Northern Blot Analyse bestätigte, dass die Transfektion mit pKK-IE4-Flag zur Expression von IE4-spezifischen Transkripten führte, die in ihrem Muster und ihrer relativen Expressionstärke den aus infizierten Zellen isolierten RNAs sehr ähnlich waren (Abb. 3.7).

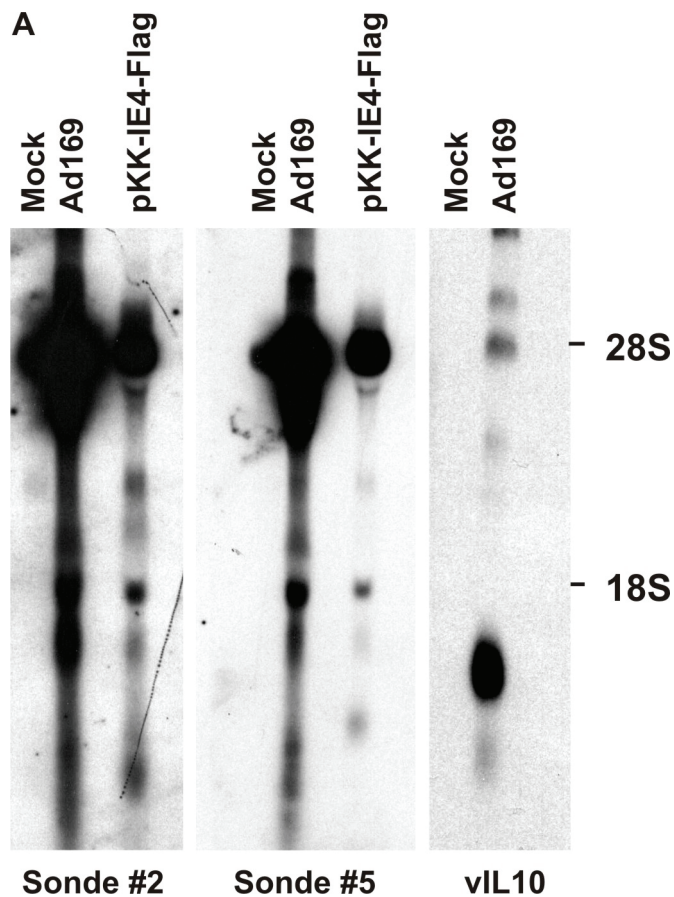
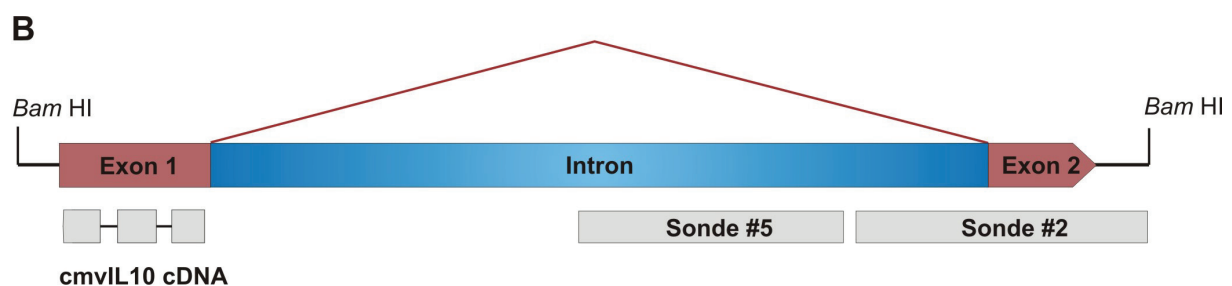


Abb. 3.7:

Nachweis der IE4-Expression des Plasmids pKK-IE4-Flag. Gesamt-RNA aus transfizierten 293T Zellen wurde 48 h nach Transfektion isoliert und 10 µg dieser RNA in die Analyse eingesetzt. **A)** Northern Blot mit Gesamt-RNA aus transfizierten 293T Zellen, Gesamt-RNA aus infizierten HFF (5 d p.i.) wurde als Hybridisierungskontrolle verwendet. RNA aus pCNDAvIL10 transfizierten 293T diente als Transfektionskontrolle. Zum Größenvergleich wurden die Positionen der 28S (4718 nt) und 18S (1874 nt) rRNAs angegeben. **B)** Lokalisation der im Northern Blot verwendeten Sonde #2, Sonde #5 und cmvIL10 cDNA.



Indirekte Immunfluoreszenz

Zur Analyse einer möglichen Proteinexpression wurden 293T Zellen mit pKK-IE4-Flag transfiziert und einer indirekten Immunfluoreszenz-Analyse mit dem Anti-FlagTag Antikörper M2 unterzogen. Als positive Kontrolle diente das Plasmid pCDNAvIL10.

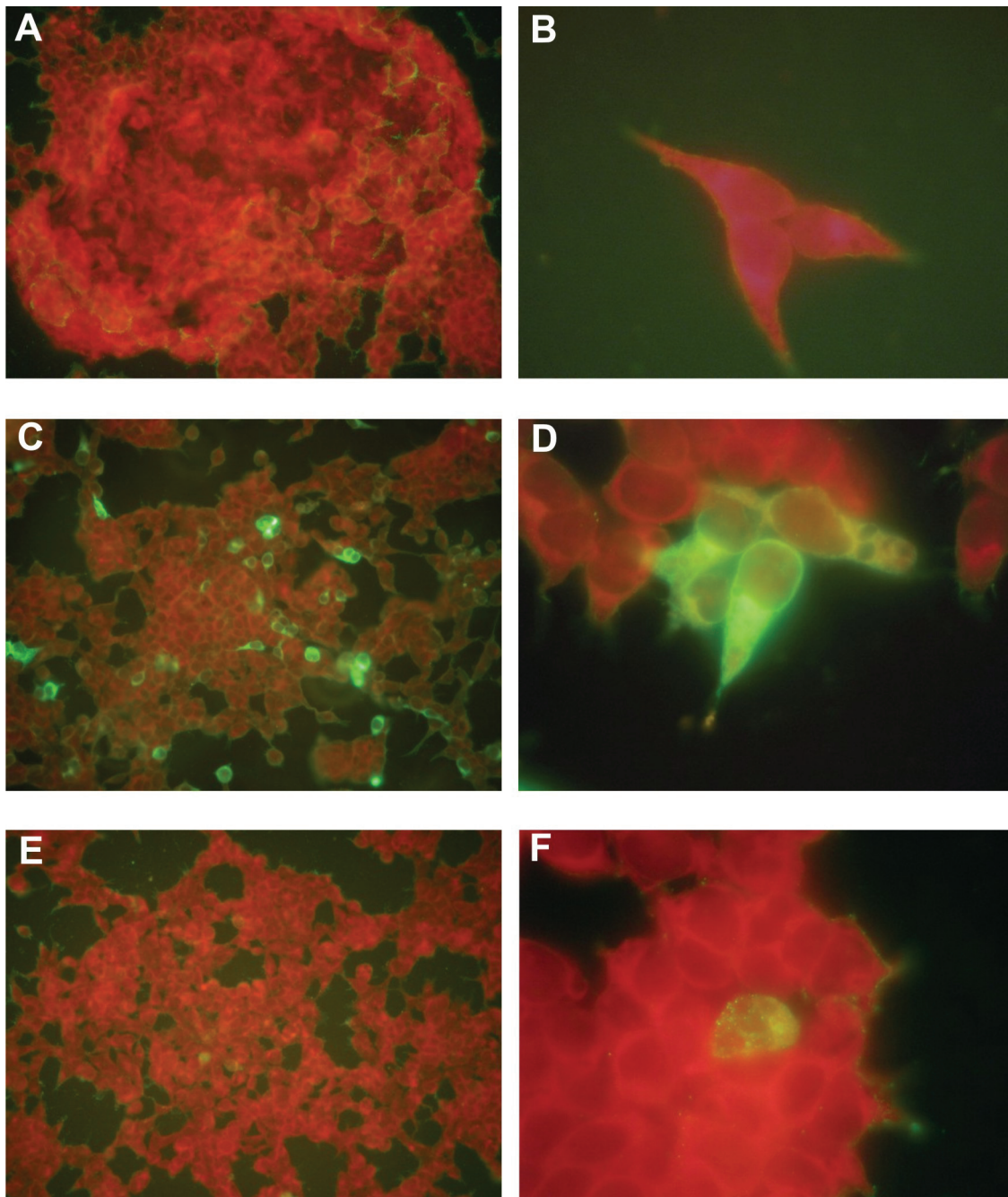


Abb. 3.8:

Nachweis eines IE4-Peptids durch indirekte Immunfluoreszenzen mit M2 Anti-FlagTag Antikörper auf transfizierten 293T Zellen. $1,5 \times 10^6$ Zellen wurden mit $10 \mu\text{g}$ der Expressionsplasmide transfiziert und 48 h nach der Transfektion mit Perfektin™ fixiert und in die Immunfluoreszenz eingesetzt.

A,B) Mock transfizierte 293T **C,D)** Transfektions-Kontrolle: pCDNAvIL10 **E,F)** pKK-IE4-Flag

A, C und E: Vergrößerung 20x B, D und F: Vergrößerung 100x.

Dieses Plasmid exprimiert als Produkt das cmvIL10, welches ebenfalls durch eine FlagTag-Sequenz markiert ist. Es wurden $1,5 \times 10^6$ 293T Zellen mit je 10 μg Expressionsplasmid in 10 cm Zellkulturschalen auf Deckgläschen transfiziert und 48 h nach der Transfektion für die Immunfluoreszenz verwendet.

Erwartungsgemäß führte die Transfektion von pCNDAvIL10 zur Expression des viralen IL10. Dieses Protein ist ausschließlich zytoplasmatisch lokalisiert. Erstaunlicher Weise zeigen aber auch einige der Zellen, die mit pKK-IE4-Flag transfiziert wurden, eine spezifische zytoplasmatische Anfärbung. Der Anteil an gefärbten Zellen war jedoch deutlich geringer als nach Transfektion mit pcDNavIL10 (0,3% bei pKK-IE4-Flag zu 10% bei pcDNavIL10). Auch zeigte sich im Vergleich zu cmvIL10 ein anderes Verteilungsmuster. Während cmvIL10 homogen im Zytoplasma verteilt erschien, zeigt das in pKK-IE4-Flag-transfizierten Zellen nachgewiesene Protein eine granuläre zytoplasmatische Verteilung (Abb. 3.8). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass eine oder mehrere der von diesem Plasmid transkribierten RNAs für ein Protein oder Peptid kodierte und dass dieses Peptid eine zum Nachweis hinreichende Stabilität in der Zelle aufwies.

Western Blot Analyse

Zur weiteren Analyse eines möglichen IE4-Proteins wurde eine Western Blot Analyse mit transfizierten 293T Zellen durchgeführt. Dazu wurden $1,5 \times 10^6$ 293T Zellen in Zellkulturschalen (10 cm) mit den Expressionsplasmiden transfiziert und 48 h nach Transfektion lysiert. Die isolierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE ihrer Größe nach aufgetrennt und geblottet. FlagTag fusionierte Proteine wurden anschließend mit dem Antikörper M2 (Sigma-Aldrich) detektiert. Mit dem pcDNavIL10 Expressionsplasmid transfizierte 293T Zellen dienten als Positiv-Kontrolle, mit pcDNA-Vektor transfizierte Zellen wurden als Negativ-Kontrolle eingesetzt. Wie erwartet konnte ein Signal, welches dem cmvIL10 entsprach, im Bereich von 20 kDa gefunden werden (Kotenko *et al.*, 2000). In pKK-IE4-Flag transfizierten Zellen konnte ein deutliches spezifisches Signal im Bereich der Lauffront detektiert werden, das in den Kontrollen nicht vorhanden war (Abb. 3.9). Der Vergleich mit einem eingesetzten Größenstandard ergab ein Molekulargewicht von unter 11 kDa. Dieses Ergebnis zeigte, dass der von Rawlinson und Barrell (1993) beschriebene Leserahmen heterolog exprimiert werden kann, dass aber offensichtlich kein weiteres, größeres Protein, etwa durch alternative Spleißvorgänge gebildet wird.

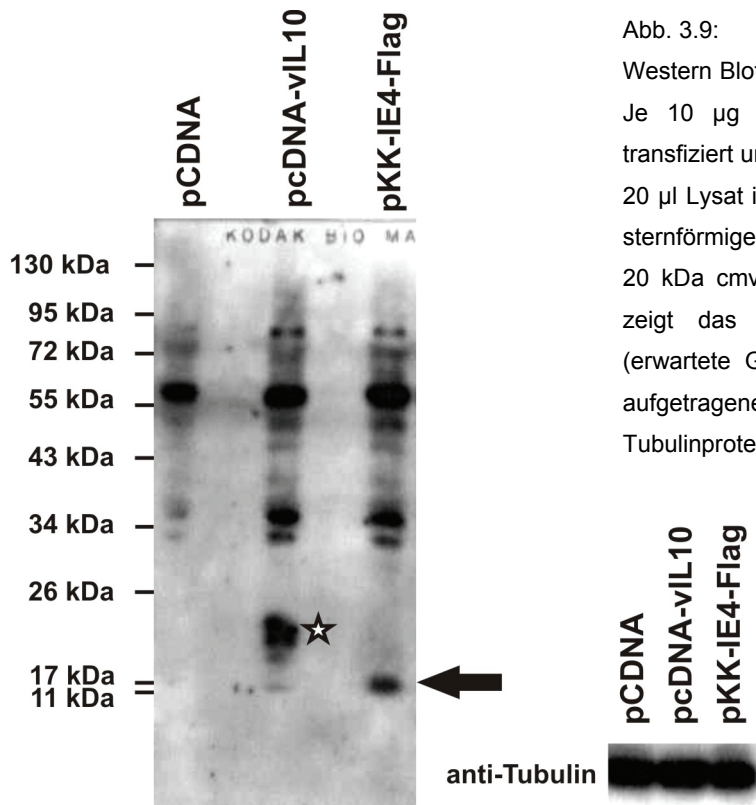


Abb. 3.9:

Western Blot Analyse transfizierter 293T Zellen. Je 10 µg der Expressionsplasmide wurden transfiziert und die Zellen 48 h später lysiert und 20 µl Lysat in den Western Blot eingesetzt. Die sternförmige Markierung zeigt die Position des 20 kDa cmvIL10 Proteins. Der schwarze Pfeil zeigt das Signal des FlagTag-IE4-Peptids (erwartete Größe 4 kDa). Zum Vergleich der aufgetragenen Proteinmengen wurde das Tubulinprotein verwendet.

Datenbankanalyse des Peptids

Eine *In-silico* Analyse sowohl der Nukleinsäuresequenz des von Rawlinson und Barrell (1993) beschriebenen ORFs als auch der vermuteten Aminosäuresequenz des Peptids (Abb. 3.10) ergaben keine signifikanten Homologien zu Nukleotidsequenzen oder Polypeptiden anderer Organismen. Die Datenbanksuche wurde mit Hilfe der Software BLAST (Online zur Verfügung gestellt auf <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) mit den Algorithmen blastn und blastx zur Analyse der Nukleinsäuresequenz und dem blastp Algorithmus zur Untersuchung der Aminosäuresequenz durchgeführt.

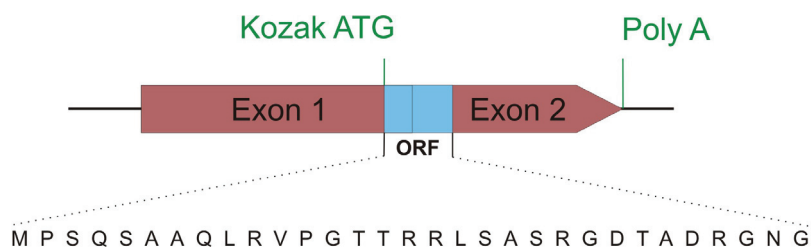


Abb. 3.10:

Darstellung der Peptidsequenz des putativen offenen Leserahmens der mRNA nach Rawlinson und Barrell (1993).

3.2. Funktionelle Analyse des IE4-Gens anhand von viralen Deletionsmutanten

Zu Beginn dieser Arbeit war wenig über die Funktion der IE4-Genregion des HCMV und der von ihr kodierten RNAs bekannt. Um eine mögliche Funktion des IE4-Bereichs näher zu untersuchen, wurden in Vorarbeiten in unserer Arbeitsgruppe (Pepperl, 2000)

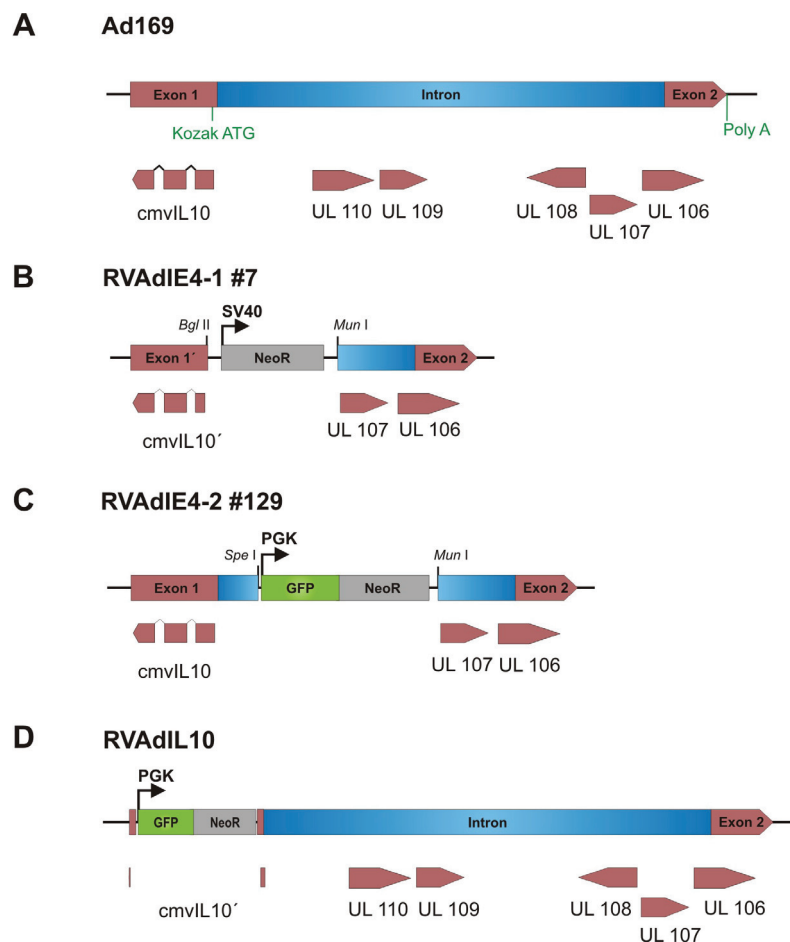


Abb. 3.11:

A) Schematische Darstellung des IE4-Bereichs aus Ad169 mit den ORFs über 300 bp (UL106-110) und dem cmvIL10 Gen **B)** Darstellung des IE4-Bereichs der Mutante RVAdIE4-1 #7. In dieser Mutante wurde der Abschnitt zwischen der *Bgl*II und der *Mun*I Schnittstelle im IE4-Bereich durch eine Neomycinresistenz (NeoR) unter der Kontrolle des SV-40 Promotors ausgetauscht. Dabei wurde der Großteil des Introns und ein Teil des Exon 1 deletiert. Durch die genetische Manipulation wurde auch der 5'-Bereich des cmvIL10 Gens deletiert. **C)** IE4-Bereich der Mutante RVAdIE4-2 #129. In dieser singulären Mutante wurde der zentrale Bereich des Introns von der Schnittstelle *Spe*I bis zur Schnittstelle *Mun*I deletiert und gegen ein Neomycin-Phosphotransferase-GFP-Fusionsgen (*green fluorescent proteine*) unter der Kontrolle des murinen Phosphoglyceratkinase- (PGK) Promotors ausgetauscht. Die Expression des cmvIL10 (UL111a) und die Produktion der IE4-mRNA wurden nicht beeinträchtigt. **D)** Schematische Darstellung des IE4-Bereichs aus RVAdIL10. In dieser singulären Mutante wurde der Bereich des cmvIL10 Gens gegen eine NeoR-GFP Kasette ausgetauscht und dabei der zentrale Teil des cmvIL10 Gens deletiert. Da das cmvIL10 Gen auf dem komplementären Strang des Exon 1 des IE4-Bereichs kodiert wird, wurde durch die Deletion auch Exon 1 des IE4-Transkripts entfernt.

IE4-Deletionsmutanten auf Basis des Laborstammes Ad169 hergestellt (Abb.3.11). Die Etablierung dieser Mutanten erfolgte seiner Zeit durch konventionelle, homologe Rekombination des HCMV Genoms in eukaryonten Zellen (Wolff *et al.*, 1993). Diese Mutanten stellten die Grundlage für Analysen dar, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden.

3.2.1. Analyse des Wachstumsverhaltens der IE4-Deletionsmutanten

In einem ersten Versuchsansatz wurde geprüft, inwieweit die Deletionen im IE4-Bereich des HCMV-Genoms zu Einschränkungen der Vermehrungsfähigkeit der resultierenden Virusmutanten führte. Dazu wurden HFF Zellen mit einer MOI von 0,001 infiziert und für einen Zeitraum von 16 Tagen inkubiert. In einem 48 stündigen Zyklus wurden Proben des Zellkulturüberstandes entnommen und zur weiteren Analyse weggefroren. Nach Abschluß der Probengewinnung wurden diese Proben aufgetaut und in 96 Lochplatten in Verdünnungsreihen zu vorher ausgesäten HFF zugegeben. In der Folge wurde in jeder Vertiefung die Anzahl derjenigen Zellen mittels Immunfärbung bestimmt, die das virale IE1 Protein exprimierten. Diese Zahl wurde als Maß für die Zahl infektiöser Viruspartikel im Zellkulturüberstand herangezogen und graphisch als Wachstumskinetik dargestellt (Abb. 3.12 A).

Die Mutante RVAdIE4-1 #7 zeigte in dieser Analyse in ihrer Vermehrungsfähigkeit keinen Unterschied zum parentalen Stamm Ad169. Im Gegensatz hierzu zeigten die beiden Mutanten RVAdIE4-2 #129 und RVAdIL10 deutlich verzögerte und auch verminderte Raten der Freisetzung infektiöser Viruspartikel. Dieses Ergebnis war deshalb erstaunlich, da in der Mutante RVAdIE4-2 #129 der gleiche Genombereich wie in der Mutante RVAdIE4-1 #7 deletiert war, in der Tat fehlten sogar in RVAdIE4-1 #7 noch weitere Genomabschnitte (Abb. 3.11).

Zur Verifikation dieses Ergebnisses wurde eine zweite, unabhängige Methode angewendet. Mit Hilfe des *Real-Time* PCR Verfahrens wurde unter Verwendung einer TaqMan™-Sonde die Anzahl der viralen Genome im Überstand infizierter HFF Kulturen absolut quantifiziert und in Abhängigkeit von der Zeit, als Maß für die Virusfreisetzung herangezogen. Die Infektion und Probengewinnung erfolgte wie oben beschrieben. Zur absoluten Quantifizierung wurde ein Plasmidstandard verwendet. Auch mit diesem Verfahren zeigte sich, dass die Mutante RVAdIE4-1 #7 in gleicher Weise wie der Ausgangsstamm Ad169 Viruspartikel, repräsentiert durch die Zahl der extrazellulären Virusgenome freisetzte (Abb. 3.12 B). Diese Mutante schien daher in ihrer Replikationsfähigkeit in der Fibroblastenkultur nicht eingeschränkt zu sein. Ähnlich wie

bei der Analyse der freigesetzten „Infektiosität“ (Abb. 3.12 A) war auch die Zahl der freigesetzten Virusgenome nach Infektion mit RVAdIE4-2 #129 und RVAdIL10 geringer als beim parentalen Stamm Ad169. Die scheinbar bessere Replikationsfähigkeit von RVAdIL10 im Vergleich zu RVAdIE4-2 #129 in diesem Experiment, lässt sich durch die höhere Menge an initial in der Zelle vorhandenen Genomen (Abb. 3.12 B) erklären. Zusammengefasst deuteten diese Ergebnisse an, dass die Deletion von definierten genomischen Abschnitten des IE4-Bereichs von HCMV zu einer deutlichen Abschwächung der Replikationsfähigkeit der resultierenden rekombinanten Viren führte.

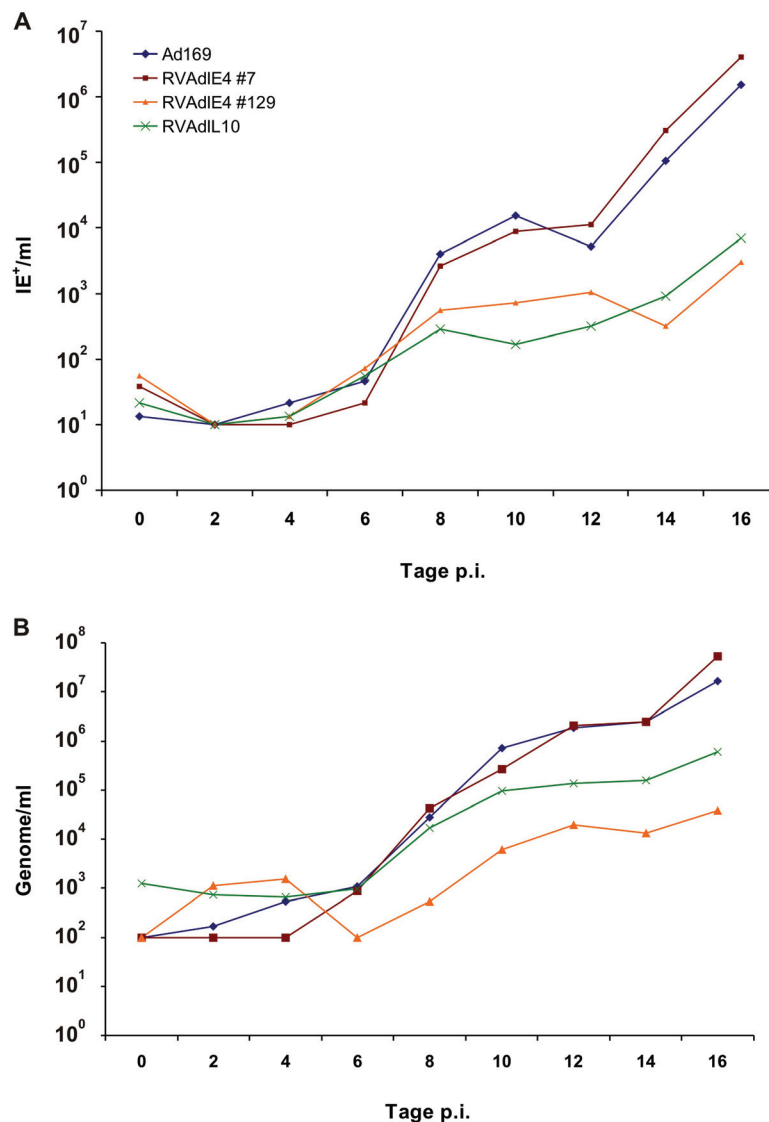


Abb. 3.12:

Wachstumskinetik der Mutanten im Vergleich zu Ad169. HFF wurden mit einer MOI von 0,001 infiziert und über einen Zeitraum von 16 Tagen inkubiert. Im 48 h Zyklus wurde Zellkulturüberstand entnommen und parallel mit Hilfe der IE1-Immundefärbung und der *Real-Time* PCR mit einer TaqMan™ Sonde untersucht. **A)** Darstellung der Ergebnisse der IE1-Immundefärbung in IE1 positiven Einheiten pro Milliliter. **B)** Darstellung der Ergebnisse der *Real-Time* PCR mit TaqMan™ Sonde in Genomen pro Milliliter.

3.2.2. Untersuchung der frühen Gen Expression im Luciferase-Test

Die Genexpression von HCMV ist streng reguliert. Den sehr frühen (*immediate early*) Genen kommt dabei eine herausragende Stellung im Rahmen der Regulierung nachgeschalteter früher (*early*) Gene zu (Mocarski-ES *et al.*, 2007). Aufgrund der eingeschränkten Replikationsfähigkeit der Mutanten RVAdIE4-2 #129 und RVAdL10 lag nahe anzunehmen, dass auch die IE4- (*immediate early 4*-) Genregion Einfluss auf die Expression früher Gene des HCMV nimmt. Dies wurde beispielhaft anhand der Promotoren der Gene UL112/113 und UL97 untersucht.

Luciferase-Tests mit Ad169 basierten Mutanten

Zur Messung der viralen early-Promotoraktivierung nach Infektion standen U373-MG Glioblastom Zelllinien zur Verfügung, die das Luciferase-Reportergen unter der Kontrolle des viralen UL97 (U373-UL97), bzw. des viralen UL112/113 Promotors (U373-UL112/113) als chromosomale Integrate enthielten. Jeweils 1×10^5 dieser Zellen wurden mit den verschiedenen Viren in unterschiedlichen Infektionsstärken infiziert und für 24 h inkubiert. Die Zellen wurden anschließend lysiert und die Proben hinsichtlich ihrer Luciferase-Aktivität mit Hilfe eines käuflichen Analysekits untersucht. Der Proteingehalt des Lysats wurde gemessen und zur Normierung der Luciferase-Aktivität herangezogen. Erwartungsgemäß führte die Infektion mit dem parentalen Stamm Ad169 zu deutlicher Induktion von Luciferase-Aktivität nach Infektion von U373-UL112/113 und U373-UL97 (Abb. 3.13). Relativ hierzu zeigte die Infektion mit RVAdIL10 keine wesentlich reduzierte

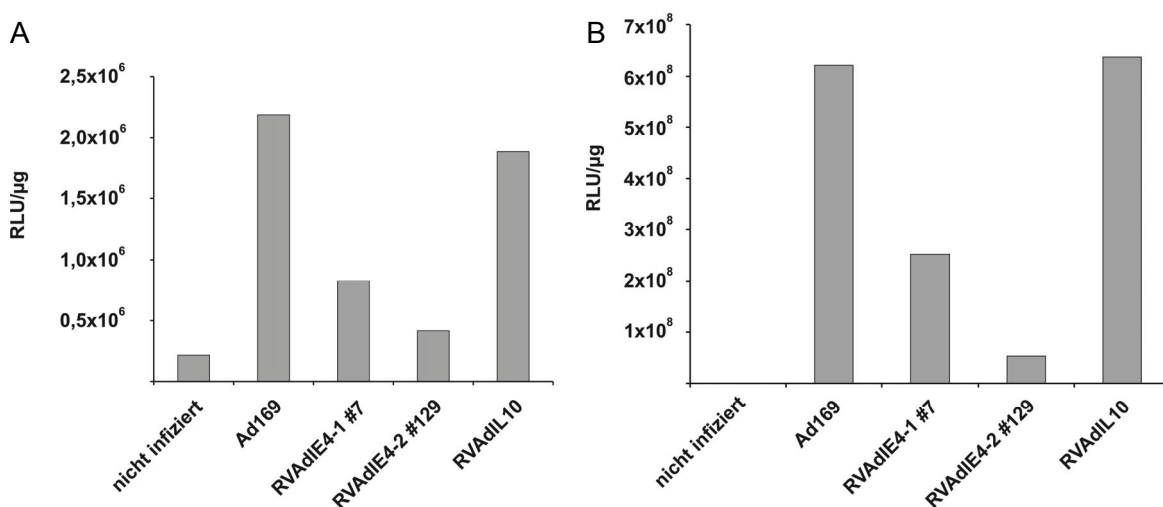


Abb. 3.13:

Luciferase-Aktivität in RLU/µg (*relative light units*) der stabil transfizierten Zelllinien U373-UL97 und U373-UL112/113 nach Infektion mit den verschiedenen Virusstämmen. Die Zellen wurden 24 h nach Infektion (MOI 4) geerntet und lysiert. Die Aktivität des Lysats wurde gemessen und auf den Proteingehalt normiert. **A**) Luciferase-Test mit infizierten U373-UL97 Zellen. **B**) Luciferase-Test mit infizierten U373-UL112/113 Zellen.

Promotoraktivierung, verglichen mit Ad169-infizierten Zellen. Im Gegensatz dazu zeigten Lysate von Zellen, die entweder mit RVAdIE4-1 #7 oder RVAdIE4-2 #129 infiziert worden waren, deutlich verminderte Luciferase-Aktivität. Dabei führte die Infektion mit der Doppelmutante RVAdIE4-1 #7 zu einer Reduktion der Luciferase-Aktivität um einen Faktor von 2-3x, während Infektionen mit der singulären Mutante RVAdIE4-2 #129 eine 10-11x Reduktion, bezogen auf die WT-Situation, nach sich zog. Hierbei ist zu bemerken, dass bei wiederholter Durchführung der Analyse und auch bei Verwendung verschiedener infektiöser Dosen die deutlichere Einschränkung der Promotoraktivierung nach Infektion mit RVAdIE4-2 #129 reproduzierbar war.

Luciferase-Test mit einer TB40_E basierten Mutante

Alle bis zu diesem Punkt der Analyse verwendeten Mutanten waren durch gezielte homologe Rekombination in eukaryonten Zellen und anschließender Selektion, bzw. Plaquereinigung hergestellt worden. Bekanntermaßen sind jedoch derartige Manipulationen des 230 kb Genoms von HCMV bezüglich sekundärer, nicht erwünschter Veränderungen der viralen DNA anfällig. Um auszuschließen, dass die beobachteten Effekte der Deletionsmutanten auf zufällige Mutationen in anderen Bereichen des Genoms zurückzuführen waren, wurde ein dem RVAdIE4-2 #129 analoges Virus vor dem Hintergrund eines anderen Ausgangsstammes, des als TB40_E (Sinzger *et al.*, 1999) bezeichneten Stammes, reproduziert. Bei TB40_E handelt es sich um ein klinisches Isolat des HCMV. Durch diesen Ansatz sollte daher auch ausgeschlossen werden, dass es sich bei den beobachteten Effekten um ein laborstamm-spezifisches Phänomen handelt. Die daraus entstandene Mutante RVTBIE4 #29 wurde im Luciferase-Test wie oben beschrieben analysiert und mit Ad169, RVAdIE4-2 #129 und TB40_E verglichen. Es zeigte sich, dass auch die Mutante RVTBIE4 #29 eine deutliche Einschränkung in ihrer

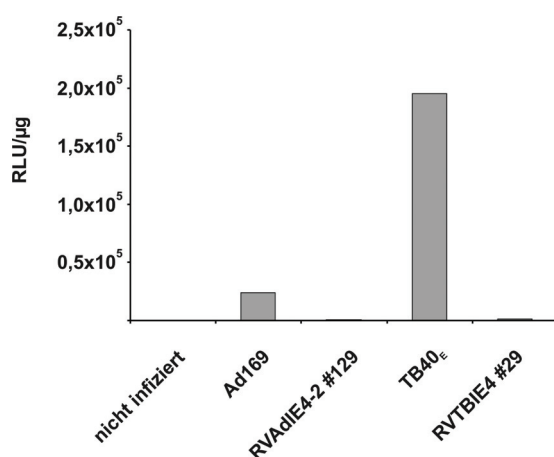


Abb. 3.14:

Normierte Luciferase-Aktivität der stabil transfizierten Zelllinie U373-UL112/113 24 h nach der Infektion (MOI 0,1) mit den Mutanten RVAdIE4-2 #129, RVTBIE4 #29 und den Wildtypviren Ad169 und TB40_E.

Fähigkeit zur Transaktivierung der beiden getesteten Promotoren im Vergleich zum Wildtypvirus TB40_E aufwies (Abb. 3.14). Dieses Experiment zeigte, dass die beobachteten Effekte kein auf Ad169 beschränktes stammspezifisches Phänomen darstellen. Darüber hinaus wurde dadurch weitgehend ausgeschlossen, dass zufällige Mutationen des HCMV Genoms für die beobachteten phänotypischen Veränderungen verantwortlich waren.

3.2.3. Quantitative Analyse der Genexpression

Die quantitative *Real-Time* RT-PCR stellt momentan die sensitivste und genaueste Methode zur Quantifizierung der Transkription eines Gens dar (Bustin, 2000; Ginzinger, 2002; Huggett *et al.*, 2005). In einem ersten Versuchsansatz sollte daher mit Hilfe des relativen quantitativen *Real-Time* RT-PCR Verfahrens überprüft werden, ob die im Luciferase-Test beobachteten Effekte (Kap. 3.2.2) direkt auf Transkriptionsebene bestätigt werden konnten. Hierzu wurden HFF mit dem Wildtyp und mit den Mutanten infiziert und der relative Anteil der viralen Transkripte am Gesamt-RNA-Pool dieser infizierten HFF-Zellen, im Bezug auf den Wildtyp bestimmt. Um weiterhin festzustellen, ob eine Beeinträchtigung der beiden sehr frühen Gene IE1 und IE2 bzw. weiterer früherer Gene vorlag, sollten die Transkriptmengen für IE1, IE2 und für die frühen Gene UL54, UL44, UL4 und US11 untersucht werden. Letztere Gene wurden ausgewählt, da sie relativ gut charakterisiert und ihre Regulation bereits näher untersucht worden war (Landolfo *et al.*, 2003; Mocarski-ES *et al.*, 2007).

Genomnormierung

Um die Expression der IE- und E-Gene zwischen den verschiedenen eingesetzten Viren vergleichen zu können, sollten gleiche Genomzahlen pro Zelle vorhanden sein. Um vergleichbare Ausgangsbedingungen für alle verwendeten Viren zu schaffen, wurde versucht die eingesetzte Infektiosität auf die Anzahl aufgenommener Genome pro Zelle zu normalisieren (Lorz *et al.*, 2006). Dazu wurden die intrazellulären Virusgenome 12 h und 24 h p.i. aus infizierten HFF isoliert und ihre Anzahl absolut quantitativ mittels TaqManTM-PCR bestimmt (Abb. 3.15). Die in den weiteren Experimenten verwendete MOI der Mutanten wurde dann so gewählt, dass ungefähr gleiche Genomzahlen pro Zelle, verglichen zum Wildtyp, erreicht wurden. Dabei konnte jedoch festgestellt werden, dass die intrazellulären Genomzahlen eines Virus in den Replikaten einer Infektion mit Faktoren bis zu 1,5x schwankten. Unterschiede in der Expressionsstärke der Transkripte

unter 1,5x wurden daher Schwankungen bei der initialen Infektion zugeschrieben und in der folgenden Auswertung vernachlässigt.

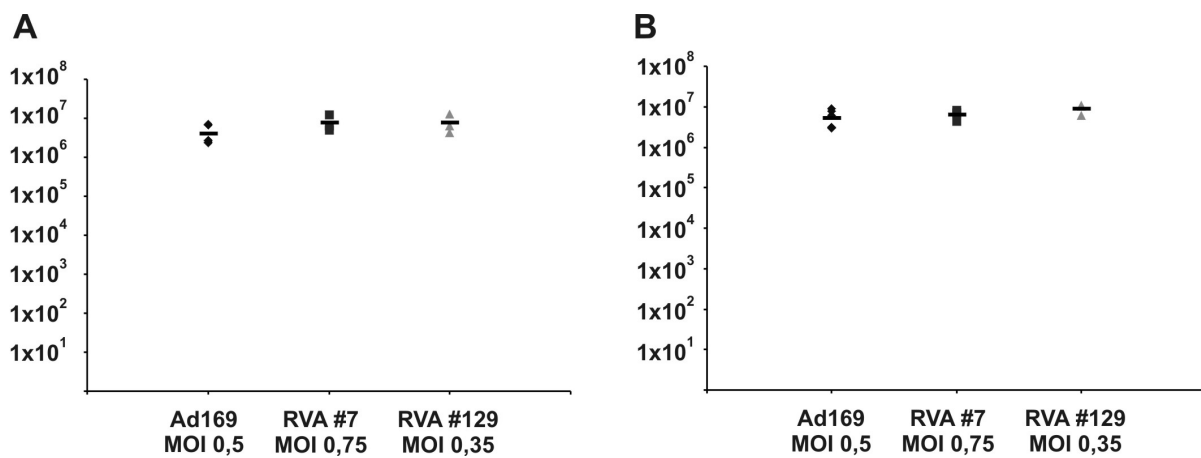


Abb. 3.15:

Ergebnisse der Genomnormalisierung der Mutanten RVA die E4-1 #7 (MOI 0,75) und RVA die E4-2 #129 (MOI 0,35) im Vergleich zu Ad169 (MOI 0,5). **A)** intrazelluläre virale Genomkopien / 2×10^5 Zellen, 12 h p.i. **B)** intrazelluläre virale Genomkopien / 2×10^5 Zellen, 24 h p.i.

Transkriptquantifizierung

Zur Analyse der relativen Expression der zu untersuchenden Gene, wurden 5×10^5 HFF mit den verschiedenen Virusstämmen infiziert. Das zur Infektion eingesetzte Volumen der verschiedenen Kulturüberstände wurde anhand der vorher für jeden Virusstock bestimmten viralen DNA-Menge auf gleiche Genomzahlen angepasst. 24 h p.i. wurden die Zellen geerntet, die Gesamt-RNA isoliert und ihre Konzentration im Photometer bestimmt. Zur Überprüfung der Genomnormierung wurden parallel die intrazellulären Genome isoliert und in einer TaqMan™-PCR quantifiziert. Dabei stellte sich heraus, dass Schwankungen der intrazellulären Genomzahlen um einen Faktor von ungefähr 1,5x auftraten. Es wurden daher nur RQ-Werte (gemessene **R**elative **Q**uantität der Transkripte) als sicher detektierte Änderung angesehen, die außerhalb des Intervalls $-0,2 / +0,2 \text{ LOG}_{10} \text{ RQ}$ lagen (entspricht einer Änderung der Transkriptmenge $\geq 1,5x$). Die Ergebnisse der *Real-Time* RT-PCR wurden mit Hilfe der komparativen Methode ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$) ausgewertet (Livak & Schmittgen, 2001), wenn diese aufgrund der Effizienzvalidierung anwendbar war (Kap. 2.6.12). Für die Gene UL112/113 und UL4 war dies nicht der Fall. Daher wurden für diese Gene relative Standardkurven zur Bestimmung der relativen Quantität eingesetzt.

Analyse der Mutante RVAdIE4-1 #7

Mit der Mutante RVAdIE4-1 #7 konnten keine reproduzierbaren signifikanten Änderungen der Transkriptmengen der untersuchten Gene im Vergleich zum Wildtyp Ad169 gefunden werden (Abb. 3.16), obwohl die Analyse im Luciferase-Test Änderungen der Promotoraktivität und somit auch der Transkriptmengen, für die Gene UL112/113 und UL97 erwarten ließ (Kap. 3.2.2). Die Untersuchungen der Luciferase-Aktivität ergaben Reduktionen der Promotoraktivität um den Faktor 2-3x. Änderungen dieser Größenordnung liegen jedoch nahe an den durch die Infektion bedingten Schwankungen (siehe Kapitel Genomnormierung).

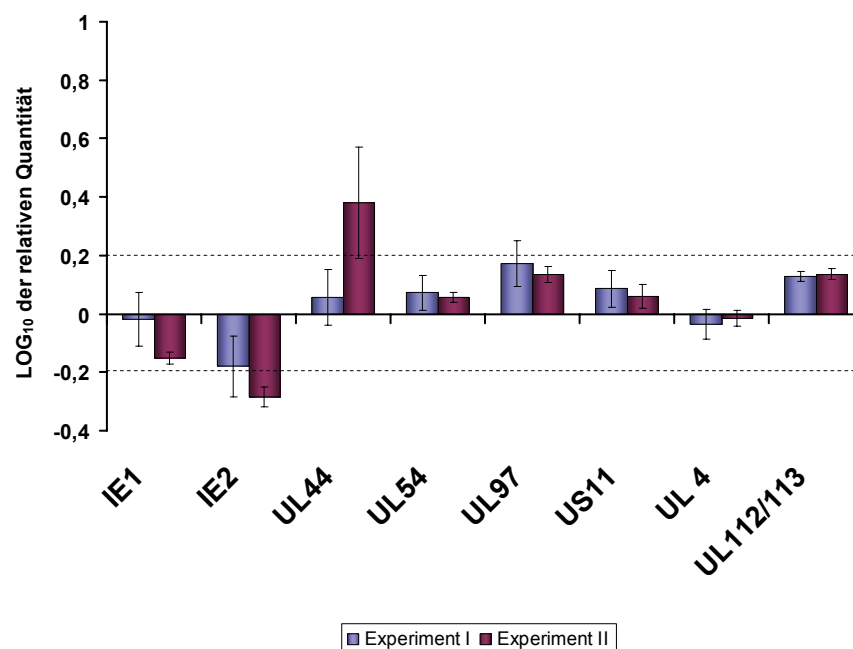


Abb. 3.16:

Relative Quantifizierung der Genexpression der Mutante RVAdIE4-1 #7 im Vergleich zum Wildtyp Ad169. Gesamt-RNA aus infizierten HFF wurde 24h p.i. gewonnen und in die *Real-Time* RT-PCR eingesetzt. Es wurden jeweils Triplets gemessen und das Experiment mit einer zweiten unabhängigen RNA-Isolation wiederholt. Die Fehlerbalken beruhen auf den jeweiligen RQ_{max} und RQ_{min} Werten. Das Intervall $-0,2 / +0,2$ LOG_{10} relative Quantität legt den Bereich der durch die Infektion bedingten Hintergrundschwankung fest. Nur solche RQ-Werte, die außerhalb dieses Intervalls lagen wurden als Änderungen der Transkriptmenge betrachtet.

Analyse der Mutante RVAdIE4-2 #129

Die Analyse der Genexpression der Mutante RVAdIE-2 #129 ergab deutliche Änderungen der Transkriptmengen im Vergleich zum Wildtyp Ad169 (Abb. 3.17). Die im Luciferase-Test beobachtete Verringerung der Promotoraktivität der Gene UL112/113 und UL97 um einen Faktor von 10-11x konnte durch die gemessenen Transkriptmengen bestätigt werden. Auch das *immediate early* Gen IE2 und die untersuchten frühen Gene

UL54, UL44, UL4 und US11 zeigten im Mittel eine Verringerung der jeweiligen Transkriptmenge, die deutlich größer als das Intervall der infektionsbedingten Schwankungen war.

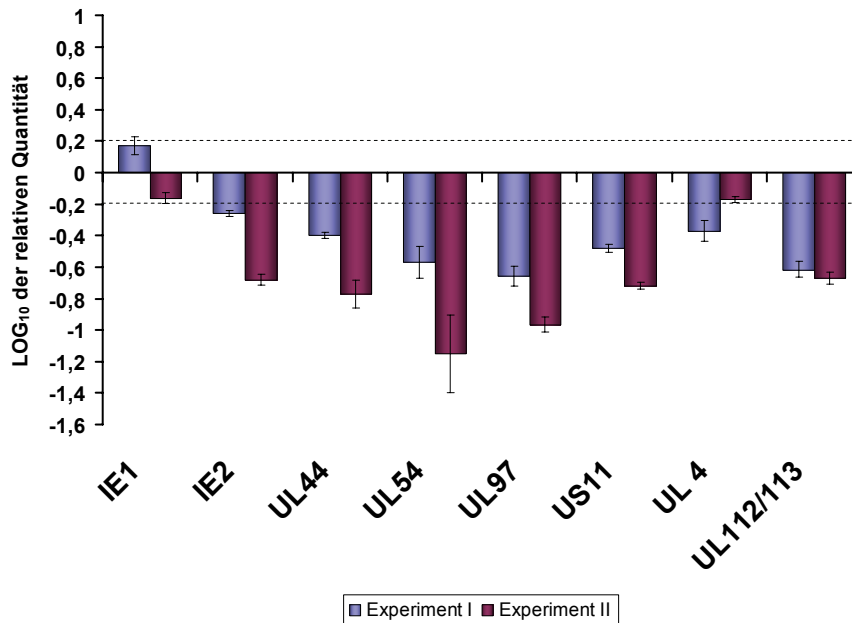


Abb. 3.17:

Darstellung der Ergebnisse der relativen Quantifizierung der Genexpression der Mutante RVAdIE4-2 #129 im Vergleich zum Wildtyp Ad169. Versuchsbeschreibung siehe Legende Abb. 3.16.

Analyse der Mutante RVAdIL10

Die Genexpression der Deletionsmutante RVAdIL10 zeigte in der Analyse keine eindeutig reproduzierbaren Veränderungen der Transkriptmengen der untersuchten Gene (Abb. 3.18). Für die Gene IE1, UL97, US11 und UL112/113 konnten zwar

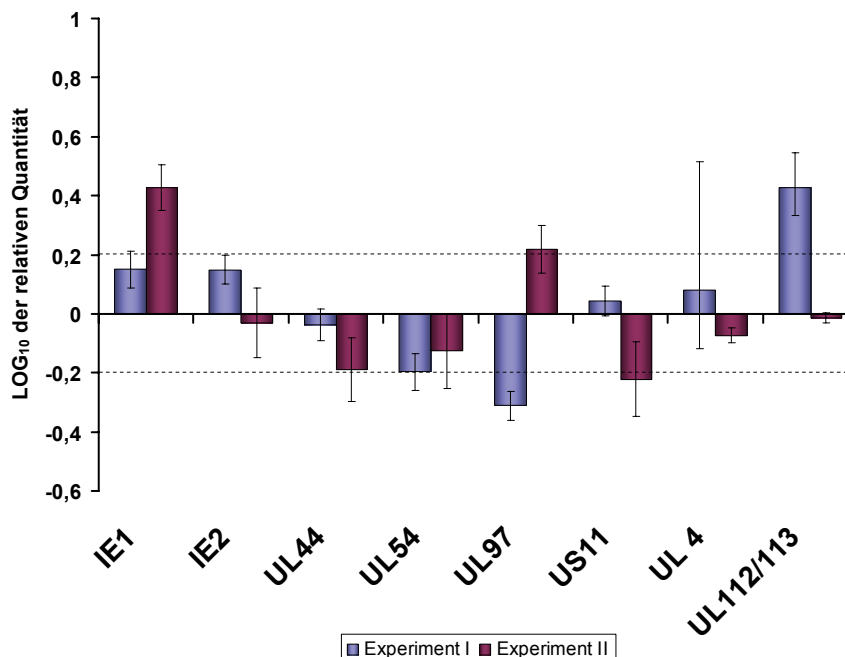


Abb. 3.18:

Ergebnisse der *Real-Time* RT-PCR mit Gesamt-RNA aus infizierten HFF. Die Relative Quantifizierung der Genexpression der Mutante RVAdIL10 ist im Vergleich zum Wildtyp Ad169 dargestellt. Vollständige Versuchsbeschreibung siehe Abb. 3.16.

Veränderungen gemessen werden, die außerhalb der Intervallgrenzen lagen, diese konnten jedoch nicht reproduziert werden. Diese Beobachtungen bestätigten die Ergebnisse der Luciferase-Tests mit dieser Mutante, in denen ebenfalls keine reproduzierbare Veränderung der Promotoraktivität der Gene UL112/113 und UL97 gemessen werden konnte.

Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse eine Bestätigung der Effekte im Luciferase-Test. Die beobachtete Reduktion der Genexpression konnte für die Mutante RvAdIE4-2 #129 in beiden Verfahren nachgewiesen werden, während die Reduktion der Mutante RvAdIE4-1 #7 in unserem *Real-Time* RT-PCR System nicht reproduziert werden konnte. Es muss davon ausgegangen werden, dass die PCR Bedingungen hier nicht ausreichend optimiert waren, um die notwendige feine Auflösung und damit verbunden die notwendige Reproduzierbarkeit zu erreichen. Für die Mutante RvAdIL10 stimmen die Ergebnisse des Luciferase-Tests und der *Real-Time* RT-PCR überein: in keinem der beiden Testverfahren konnte eine Reduktion der Genexpression gemessen werden.

3.2.4. Einfluss des IE4-Bereichs auf Apoptose in HFF

Ähnlich wie HCMV exprimieren die verwandten α -Herpesviren HSV-1 und HSV-2 abundante Transkripte, die als stabile Intronsequenzen identifiziert und als *Latency Associated Transcripts* (LATs) bezeichnet wurden (Wu *et al.*, 1998). Allerdings werden HSV-LATs im Gegensatz zu IE4 bevorzugt während der viralen Latenz exprimiert (Spivack & Fraser, 1988). Neuere Erkenntnisse deuten darauf hin, dass LATs des HSV-1 keine Proteine kodieren, wohl aber den programmierten Zelltod infizierter Zellen behindern. Durch diese Eigenschaft tragen LATs zur Vermehrung der Viren bei.

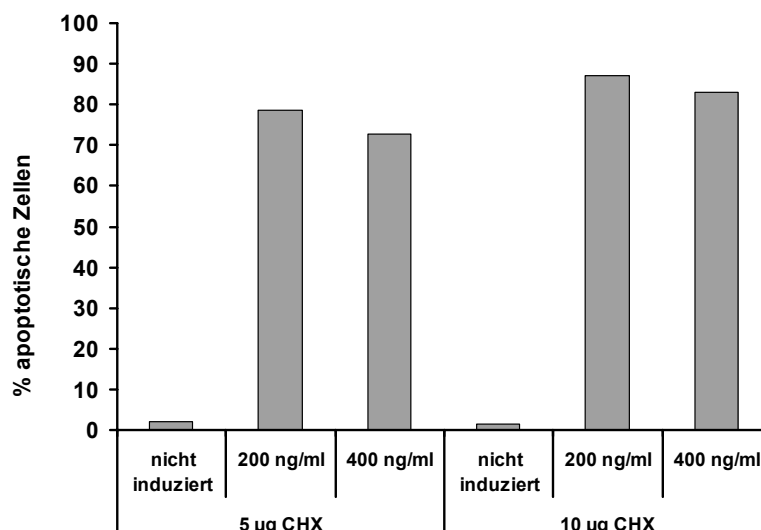


Abb. 3.19: Bestimmung der Sensitivität primärer humaner Fibroblasten gegenüber der Induktion extrinsischer Apoptose. Zur Induktion des Fas(CD95)-Rezeptor-Signalwegs wurden 1×10^5 HFF mit 200 ng/ml bzw. 400 ng/ml Anti-CD95-AK behandelt. Zeitgleich wurde die Neusynthese von Proteinen durch 5 bzw. 10 µg CHX geblockt.

Aufgrund dieser Analogie der LATs zu den von der IE4-Region exprimierten Transkripten lag nahe, eine mögliche anti-apoptotische Funktion dieser Genomregion anzunehmen. Um dies zu untersuchen, wurden HFF mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert und die Induktion von Apoptose in diesen Zellen gemessen. In einem Vorversuch wurde zunächst die Sensitivität primärer, humaner Fibroblasten gegenüber Fas-Rezeptor (CD95)-vermittelter Apoptose getestet. Dazu wurden 1×10^5 HFF ausgesät und am folgenden Tag mit Anti-CD95-Antikörper (Anti-CD95-AK) in steigenden Konzentrationen zur Induktion extrinsischer Apoptose inkubiert. Es wurde zeitgleich mit 5 und 10 $\mu\text{g/ml}$ Cycloheximid (CHX) die Synthese von Proteinen unterbunden, um die *de-novo* Synthese anti-apoptotischer Proteine während der Induktion der Apoptose zu verhindern. Die Zellen wurden fixiert, nach Nicoletti et al. (1991) mit Propidiumiodid gefärbt und anschließend im FACS analysiert. Die Ergebnisse dieser Analysen zeigten, dass bis zu 80% der Fibroblasten nach Aktivierung CD95-vermittelter Signaltransduktion apoptotische Veränderungen aufwiesen (Abb. 3.19).

Um zu untersuchen, ob durch die Expression des IE4-Bereichs die Fas-Rezeptor(CD95)-vermittelte extrinsische Apoptose (mit anti-CD95-AK induziert) beeinflusst wird, wurden

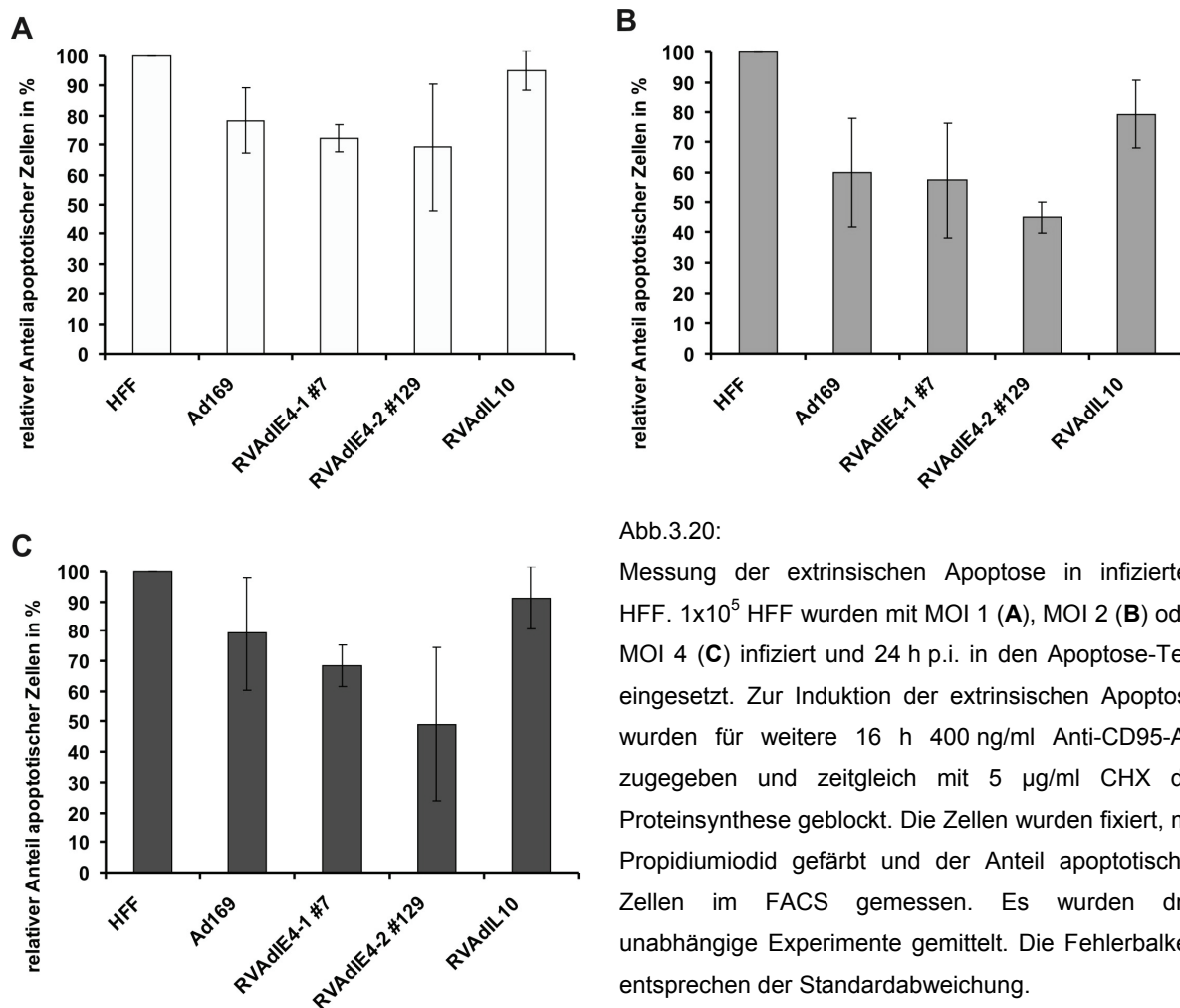


Abb.3.20:

Messung der extrinsischen Apoptose in infizierten HFF. 1×10^5 HFF wurden mit MOI 1 (A), MOI 2 (B) oder MOI 4 (C) infiziert und 24 h p.i. in den Apoptose-Test eingesetzt. Zur Induktion der extrinsischen Apoptose wurden für weitere 16 h 400 ng/ml Anti-CD95-AK zugegeben und zeitgleich mit 5 $\mu\text{g/ml}$ CHX die Proteinsynthese geblockt. Die Zellen wurden fixiert, mit Propidiumiodid gefärbt und der Anteil apoptotischer Zellen im FACS gemessen. Es wurden drei unabhängige Experimente gemittelt. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

1×10^5 HFF Zellen am Vortag in 6-Well Platten ausgesät und anschließend mit MOIs von 1, 2 oder 4 infiziert. Nach 24 h wurde die weitere Proteinsynthese in den infizierten Zellen mit CHX geblockt und die Zellen für weitere 16 h inkubiert. Zeitgleich wurde mittels Anti-CD95-AK die Fas-Rezeptor(CD95)-vermittelte Apoptose induziert und die Zellen anschließend gefärbt und im FACS analysiert. Zur Messung der allein infektionsbedingten Apoptose in HFF (nicht mit anti-CD95-AK induziert) wurden 1×10^5 HFF, wie oben beschrieben, in 6-Well Platten infiziert. 24 h p.i. wurde die Proteinsynthese für 16 h mit CHX blockiert und die Zellen anschließend fixiert, gefärbt und analysiert.

Die Infektion von HFF mit Ad169 führte wie erwartet zu einer Reduktion der extrinsischen Apoptose im Vergleich zu mock-infizierten Zellen, bedingt durch die von Ad169 exprimierten anti-apoptotischen Proteine (Michaelis *et al.*, 2004). Die Infektion von HFF mit den Deletionsmutanten und nachfolgender Induktion der extrinsischen Apoptose führte jedoch zu keiner signifikanten Steigerung des Anteils apoptotischer Zellen, relativ zur Infektion mit Wildtyp-Virus (Abb. 3.20). Die Mutante RVAdIL10 zeigte zwar tendenziell einen erhöhten Anteil der apoptotischen Zellen von ~10% im Vergleich zum Wildtyp Ad169. Diese Abweichung erreichte jedoch keine ausreichende statistische Signifikanz (2-seitiger T-Test, $H_0 : \mu_{Ad169} = \mu_{RVAdIL10}$; $p > 0,30$).

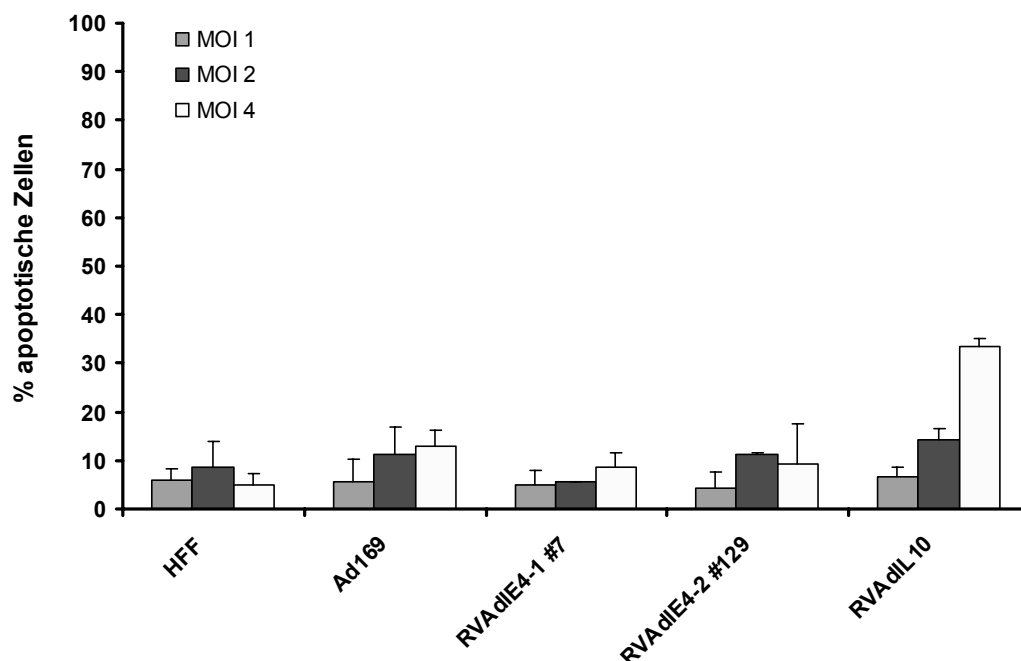


Abb. 3.21:

Vergleich der intrinsischen Apoptose in infizierten HFF. 1×10^5 Zellen wurden infiziert (MOI 1, 2 oder 4) und 24 h p.i. mit 5 $\mu\text{g/ml}$ CHX für weitere 16 h behandelt. Die Zellen wurden fixiert, mit Propidiumiodid gefärbt und der Anteil apoptotischer Zellen im FACS gemessen. Es wurden drei unabhängige Experimente gemittelt. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

Die Bestimmung der durch Infektion ausgelösten (intrinsischen) Apoptoseraten, zeigte im Falle von RVAdIE4-1 #7 und RVAdIE4-2 #129 keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp Ad169 (Abb. 3.21). Im Falle der Mutante RVAdIL10 konnte jedoch bei einer Infektion mit MOI 4 ein ungefähr 2x höherer Anteil apoptotischer Zellen im Vergleich zu Ad169 gemessen werden.

Aus diesen Daten kann geschlossen werden, dass im Intronbereich des IE4-Transkripts keine Faktoren kodiert werden, die Einfluss auf die Induktion von Apoptose in humanen Fibroblasten nehmen. Lediglich die Deletion des viralen IL10 Gens (UL111a) in der Mutante RVAdIL10 führte bei der Messung der intrinsischen Apoptose mit einer Infektionsstärke von MOI 4 zu einem erhöhten Anteil apoptotischer Zellen. Dieses Virus weist im Vergleich zu den anderen Stämmen jedoch eine erhöhte sog. „particle to infectivity ratio“ auf. Dies hat zur Folge, dass zur Erlangung einer vergleichbaren Infektionsstärke mehr Viruspartikel zu den Zellen gegeben werden mussten als bei den anderen Viren. Da bereits die Adsorption und Penetration nicht-infektiöser Partikel des HCMV Apoptose in bestimmten Zelllinien auslösen (Sindre *et al.*, 2000), ließe sich daraus die erhöhte Induktion von programmiertem Zelltod nach Infektion mit RVAdIL10 erklären. Auf weiterführende Untersuchungen unter Berücksichtigung anderer Zelltypen wurde aufgrund der fehlenden Permissivität der meisten Zellkultursysteme für HCMV-Infektion verzichtet.

3.3. Kotransfektion von IE1/IE2-Expressionsplasmiden mit IE4-Expressionsplasmiden

Die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit und die Ergebnisse von Kulesza und Shenk (2004) deuten darauf hin, dass es sich bei dem IE4-Transkript um eine biologisch aktive RNA handelt, die nicht für ein funktionales Protein kodiert. Da die Deletion des IE4-Bereichs in Ad169 zu einer verminderten Expression früher Gene führte (Kap. 3.2), bestand die Möglichkeit, dass die IE4-RNA an der Regulation dieser Gene beteiligt ist. Da IE1 und IE2 wichtige Transaktivatoren der frühen Genexpression darstellen, wurde in einem ersten Versuchsansatz untersucht, ob die gleichzeitige Expression von IE1/IE2 und dem IE4-Transkript in U373-UL112/113 Zellen die Expression des Luciferase-Gens positiv beeinflusst. Dazu wurden 1×10^5 U373-UL112/113 Zellen mit den jeweils angegebenen Mengen des IE1/IE2- und IE4-Expressionsplasmids kotransfiziert und 48 h später in den Luciferase-Test eingesetzt. Zur Expression des IE4-Bereichs wurde das Plasmid pKK-IE4 verwendet. Dieses Plasmid enthält den vollständigen IE4-Bereich und exprimiert das IE4-Transkript unter der Kontrolle des HCMV-MIE Promotors. Das

Expressionsplasmid pRR47 enthält den gesamten HCMV-*Major immediate early*-Locus, mit dem MIE Promotor und der kodierenden Region der ORFs UL122 und UL123.

Die Analyse im Luciferase-Test ergab, dass eine Transfektion mit dem Plasmid pKK-IE4 alleine nicht ausreichend war, um den UL112/113 Promotor zu aktivieren. Wie erwartet konnte jedoch eine Transfektion mit dem Plasmid pRR47 den UL112/113 Promotor aktivieren (Abb. 3.22), da die Expression des UL112/113 Gens stark von der Expression des viralen Transaktivators IE2 abhängt (Arlt *et al.*, 1994). Zum Vergleich der Promotoraktivierung wurden die Zellen zum einen mit steigenden Mengen pRR47 zusammen mit dem nicht aktivierenden Plasmid pCDNAV6His (negativ Kontrolle) und zum anderen mit pRR47 und pKK-IE4 kotransfiziert. Eine Kotransfektion von pRR47 und pKK-IE4 führte im Mittel zu einer stärkeren Aktivierung des UL112/113 Promotors als eine Kotransfektion von pRR47 und pCDNAV6His. Diese Ergebnisse könnten also als Hinweis auf einen möglichen kooperativen Effekt des IE4-Transkripts auf die IE1/IE2 vermittelte Genregulation früher Gene des HCMV gedeutet werden. Allerdings waren die dargestellten Ergebnisse bei wiederholter Durchführung des Experiments nicht verlässlich reproduzierbar. Diese Methode erlaubt somit keine abschließende Bewertung eines möglichen transaktivierenden Effekts der IE4 Genregion auf die frühe Genexpression des HCMV.

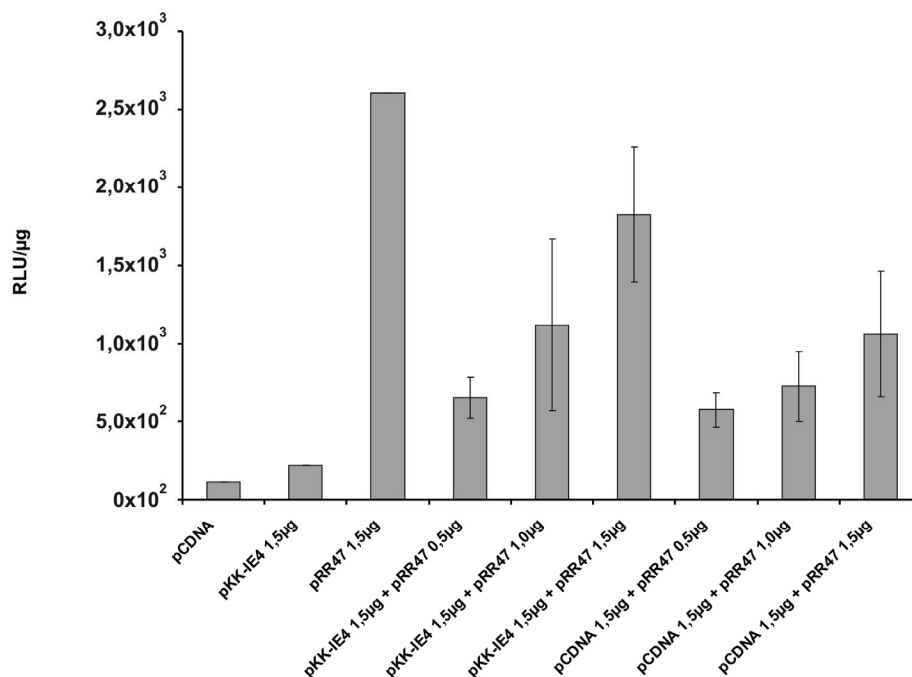


Abb. 3.22:

Kotransfektion von U373-UL112/113 Zellen mit dem IE1/IE2-Expressionsplasmid pRR47 und dem IE4-Expressionsplasmid pKK-IE4. Die angegebenen DNA-Mengen wurden in 1×10^5 Zellen mit dem MaTra™ Transfektionsreagenz eingebracht und die Zellen 48 h nach Transfektion in den Luciferase-Test eingesetzt. Als Negativkontrolle diente das Plasmid pCDNAV6His. Für die Ansätze mit Kotransfektion sind Mittelwerte aus drei parallelen Ansätzen dargestellt. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

3.4. Analyse der IE4 Genregion des HCMV mittels Mutagenese des viralen Genoms in *E. coli*

3.4.1. Herstellung von Mutanten des HCMV mittels BAC-Mutagenese

Die Methode der homologen Rekombination in eukaryonten Zellen, welche zur Herstellung der HCMV-Mutanten RVAdIE4-1 #7, RVAdIE4-2 #129 und RVAdIL10 eingesetzt wurde, zeigt eine Reihe von Limitationen. Wesentlicher Schwachpunkt ist der hohe Zeitaufwand zur Isolierung von Mutanten und Revertanten. Die Verwendung von BAC- (*bacterial artificial chromosome*) Vektoren erlaubt es, genetische Veränderungen an der 230 kb HCMV DNA in *E.coli* vorzunehmen (BAC-Mutagenese) und erst nach vollständiger Mutagenese rekombinante Viren durch Transfektion der viralen DNA in eukaryonten Zellen zu rekonstituieren. Zur Reproduktion der mit den „konventionellen Mutanten“ erhaltenen Ergebnisse und zur genaueren Analyse wurden daher durch BAC-Mutagenese gezielt weitere Mutanten des HCMV etabliert. Hierzu wurde eine auf dem *red*-Rekombinationsystem des λ -Phagen basierende Methodik eingesetzt. Die genetische Manipulation des HCMV-BAC erfolgte im *E.coli*-Stamm EL250 (Lee *et al.*, 2001), der die notwendigen Phagengene als chromosomales Integrat enthielt. Die in dieser Arbeit verwendeten EL250 Zellen tragen zusätzlich das Gen für die FLP-Rekombinase unter der Kontrolle eines arabinose-induzierbaren Promotors in ihrem

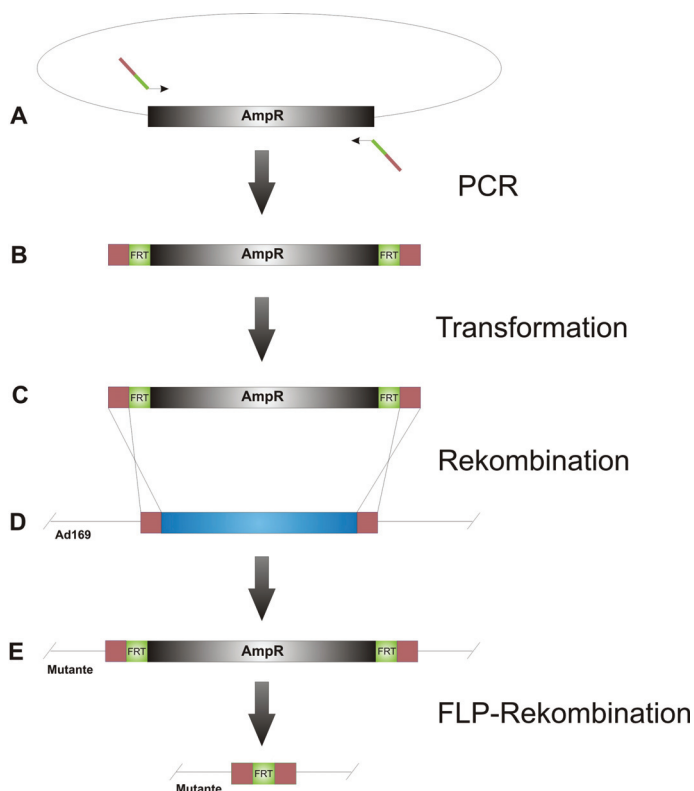


Abb.3.23:

Schematische Übersicht der BAC-Mutagenese in *E.coli* EL250. Ein Resistenzgen (z.B. Amp^R, schwarz) wurde mittels PCR amplifiziert (A). Die Enden der Primer (rot) wiesen dabei kurze Homologien von etwa 40 Basen zu definierten Abschnitten im Genom des HCMV auf (B). Diese Abschnitte flankierten die Sequenz, die durch die Rekombination entfernt werden sollte (D, blau). Die Oligonukleotide enthielten darüber hinaus jeweils eine Kopie der Erkennungssequenz für die FLP-Rekombinase (*FRT-Motiv*, grün). Das Amplifikat wurde in EL250 transformiert (C) und durch *red*-vermittelte Rekombination zwischen den homologen Sequenzabschnitten und dem viralen Genom gegen die Zielsequenz (blau) ausgetauscht (E). Die Resistenzkassette im mutierten BACmid wurde bei Bedarf mit Hilfe der FLP-Rekombinase aus dem BACmid entfernt. In den daraus resultierenden HCMV BACmiden war die jeweilige Zielsequenz durch ein FRT-Motiv ersetzt.

Genom. Dies ermöglicht das Entfernen der eingesetzten Selektionskassetten, über zusätzlich eingeführte Erkennungsstellen der FLP-Rekombinase („*FRT-Motiv*“) nach erfolgter Deletion und Selektion geeigneter Einzelkolonien (Kap. 2.6.6 und Abb. 3.23). Ein weiterer wichtiger Vorteil der BAC-Rekombination in *E.coli* ist die Möglichkeit zur Herstellung von Revertanten. Die genetische Modifikation der BAC-Klone erfolgte wie in Abb. 3.23 dargestellt. Die erfolgreiche Rekombination wurde mittels PCR und Southern-Blot überprüft. Im Folgenden wird die Konstruktion der einzelnen BAC-Mutanten des HCMV ausführlich dargelegt.

RV-KK-1

In einem ersten Versuchsansatz wurde eine BAC-Mutante hergestellt, die dem Stamm RVAdIE4-2 #129 entsprach. Dazu wurden die homologen Überhänge der Kasette so gewählt, dass sie den Bereich zwischen den Schnittstellen *SpeI* und *MunI* einschlossen. Dieser Bereich wurde durch die homologe Rekombination gegen die verwendete Ampicillinresistenz-Kassette (AmpR-Kassette) ausgetauscht, wodurch das BACmid pBAC-KK-1 entstand (Abb.3.24). Aus diesem BACmid wurde durch Transfektion in HFF der Virusstamm RV-KK-1 rekonstituiert.

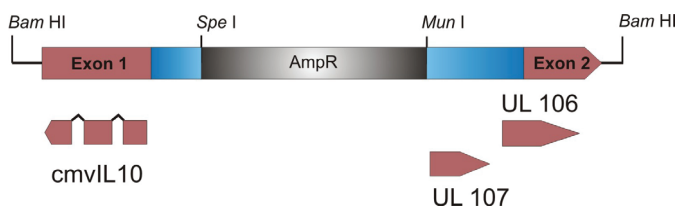


Abb. 3.24:

Darstellung des IE4-Bereichs der Mutante RV-KK-1. Der Bereich zwischen den Schnittstellen *SpeI* und *MunI* wurde gegen eine AmpR-Kassette ausgetauscht. Diese Mutante entspricht in ihrer Deletion der Mutante RVAdIE4-2 #129

RV-KK-2

Das Virus RV-KK-2 stellt die Revertante der Virusmutante RV-KK-1 dar. Das BACmid pBAC-KK-2 wurde aus dem BACmid pBAC-KK-1 hergestellt. Abweichend von der sonst verwendeten Strategie wurde für die Re-Insertion des IE4-Abschnittes ein DNA-Fragment verwendet, das zuvor aus einem Plasmid ausgeschnitten worden war. Hierzu wurde ein FRT-flankiertes Kanamycin-Resistenzgen (KanR) in eine *ZraI*-Schnittstelle im IE4-Bereich des Plasmids pGHS6 inseriert. Der IE4-Bereich wurde anschließend durch Restriktion mit *BamHI* aus pGHS6 freigesetzt, in pBAC-KK-1 tragende EL250 Bakterienzellen transformiert und durch *red*-Rekombination in pBAC-KK-1 integriert. Durch Selektion auf KanR wurden rekombinierte BACmide angereichert. Nach Vereinzelung der Klone wurde das KanR-Gen durch die Induktion der FLP-Rekombinase

entfernt. Die Revertante RV-KK-2 enthält somit neben dem reinsertierten IE4-Bereich zusätzlich ein FRT-Motiv zwischen den putativen ORFs UL109 und UL110 (Abb. 3.25).

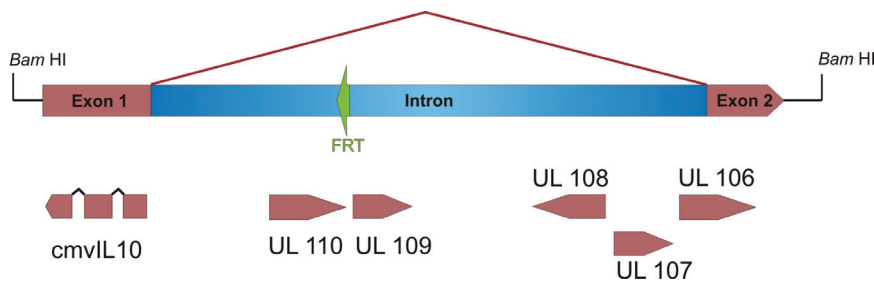


Abb. 3.25:

Schematische Übersicht des IE4-Bereichs der Revertante RV-KK-2. Die Wildtypsequenz wurde vollständig wiederhergestellt. Als Folge der BAC-Mutagenese enthält der IE4-Bereich noch zusätzlich 30 bp Fremdsequenz einer FRT-site zwischen den putativen ORFs UL109 und UL110.

RV-KK-3 / RV-3 FLP

Während der Durchführung dieser Arbeit wurden von Kulesza und Shenk Daten veröffentlicht, die zeigen, dass es sich bei der 5kb RNA um ein ungewöhnlich stabiles Intron handelt, das im Laufe der Infektion akkumuliert (Kulesza & Shenk, 2004). Die Autoren verwendeten zur Analyse eine virale Mutante in der das primäre IE4-Transkript aufgrund der Deletion der vier zentralen Nukleotide des Spleißdonors nicht mehr prozessiert werden konnte. Für die Zielsetzung dieser Arbeit erschien es wichtig, ein

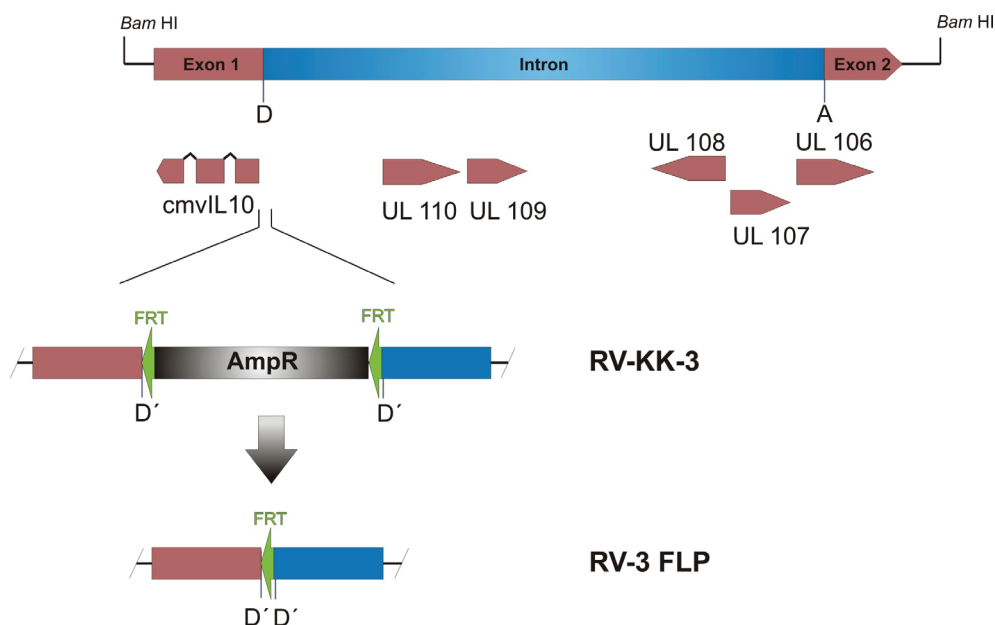


Abb. 3.26:

Schematische Darstellung des IE4-Bereichs der Mutanten RV-KK-3 und RV-3 FLP. In pHb5 wurden die vier zentralen Nukleotide des Spleißdonors durch eine AmpR-Kassette ausgetauscht. Zur Herstellung der Mutante RV-3 FLP wurde das AmpR-Gen anschließend durch die FLP-Rekombinase entfernt.

analoges Virus auf dem genetischen Hintergrund des hier verwendeten Laborstammes zur Verfügung zu haben. Hierzu wurden punktgenau die genannten vier Nukleotide des Spleiß-Donors durch ein AmpR-Gen ersetzt. Nach Vereinzelung der Klone wurde das Resistenzgen wie oben beschrieben mittels FLP-vermittelter Rekombination entfernt. In diesem Fall wurde neben dem so erhaltenen BACmid auch das BACmid, welches das Resistenzgen noch enthielt rekonstituiert. In diesen Mutanten, die als RV-KK-3 und RV-3 FLP bezeichnet wurden, ist die vollständige DNA-Sequenzinformation des IE4-Bereichs noch erhalten (Abb.3.26).

RV-KK-4 / RV-4 FLP

Diese Mutanten wurden ergänzend zur Mutante RV-3 FLP konzipiert. Da der Spleißvorgang in der Mutante RV-3 FLP verhindert wird, kann neben dem stabilen Intron auch kein 1,1 kb Spleißprodukt mehr entstehen. Ein mit der Mutante RV-3 FLP beobachteter Effekt könnte also auch auf das Fehlen der gespleißten 1,1 kb RNA zurückgehen. Um zu zeigen, dass die vollständige Deletion der IE4-Intronsequenz einen vergleichbaren Effekt, wie das Verhindern des Spleißvorganges erzeugt, wurde in den Mutanten RV-KK-4 und RV-4 FLP das IE4-Intron vollständig entfernt und gegen eine AmpR-Kassette ersetzt. Dabei wurden Spleiß-Donor und Spleiß-Akzeptor nicht beeinträchtigt, so dass die gespleißte 1,1 kb RNA gebildet werden konnte. Zur Herstellung der Mutante RV-4 FLP wurde das AmpR-Gen mit Hilfe der FLP-Rekombinase entfernt. Beide BACmide pBAC-KK-4 und pBAC-KK-4 FLP wurden rekonstituiert (Abb.3.27).

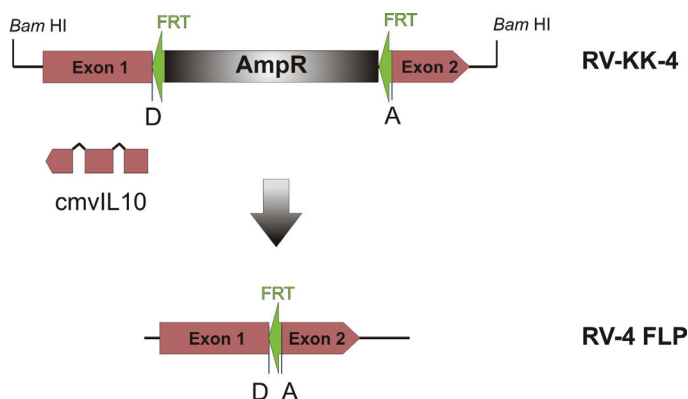


Abb. 3.27:

Übersicht über den IE4-Bereich der Mutanten RV-KK-4 und RV-4 FLP. Der vollständige Abschnitt des IE4-Introns wurde durch eine AmpR-Kassette ersetzt, wobei Spleiß-Donor und Akzeptor intakt blieben. Zur Herstellung der Mutante RV-4 FLP wurde das AmpR-Gen mittels FLP-Rekombination entfernt.

RV-KK-5

Um einen Einfluss des cmvIL10 Gens auf die frühe Genexpression zu untersuchen, wurde mittels BAC-Mutagenese eine vIL10 Deletionsmutante hergestellt. Das cmvIL10-Gen enthält drei Exons. Das dritte Exon überlappt mit dem Promotor des für die

Virusvermehrung notwendigen UL112/113 Gens (Abb. 3.28). Dieser Promotor enthält vier Bindestellen für den viralen *Immediate Early-2* (IE-2) Transaktivator (Arlt *et al.*, 1994) (Schwartz *et al.*, 1994). In der Mutante RVAdIL10 waren zwei dieser Elemente deletiert worden. Eine Beeinträchtigung der Aktivität des Gens UL112/113 konnte hier nicht ausgeschlossen werden. Bei der Konstruktion der Mutante RV-KK-5 wurde darauf geachtet, dass der UL112/113 Promotor nicht wesentlich durch die Deletion des *cmvIL10*-Gens beeinträchtigt wurde. Die Auswahl der Primer erfolgte in einer Weise, dass bei der Rekombination nur das erste der Bindeelemente deletiert wurde. Die Deletion der ersten IE2-Bindestelle alleine hat nur geringe Auswirkungen auf die Expression des Gens UL112/113 (Schwartz *et al.*, 1994; Lang *et al.*, 1995). Zur Herstellung der Mutante RV-KK-5 wurde der Bereich von dem ersten Startcodon bis zu

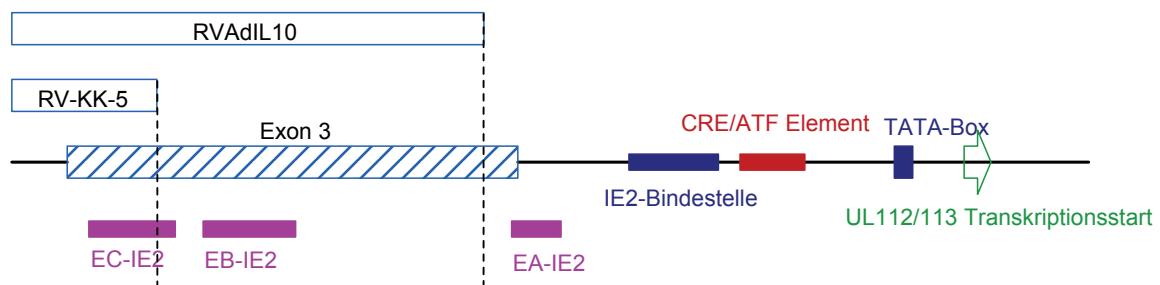


Abb. 3.28:

Übersicht der Promotorregion des Gens UL112/113 mit ihren regulativen Elementen. Der Bereich des Exon 3 (blaue Box, diagonal gestreift) des Gens UL111a (*cmvIL10*) überlappt mit drei der IE2-Bindestellen (violette Boxen EA-IE2 bis EC-IE2, (Arlt *et al.*, 1994)). Der Promotor enthält eine weitere IE2-Bindestelle (dunkelblaue Box, (Schwartz *et al.*, 1994)) und eine Bindestelle für den zellulären Transkriptionsfaktor CRE/ATF (rote Box). Die TATA-Box und der Transkriptionsstart markieren den zentralen Bereich des UL112/113-Promotors. Die durch die Deletionen in den Mutanten RVAdIL10 und RV-KK-5 beeinträchtigten Abschnitte des Promotors sind durch offene blaue Kästen angezeigt.

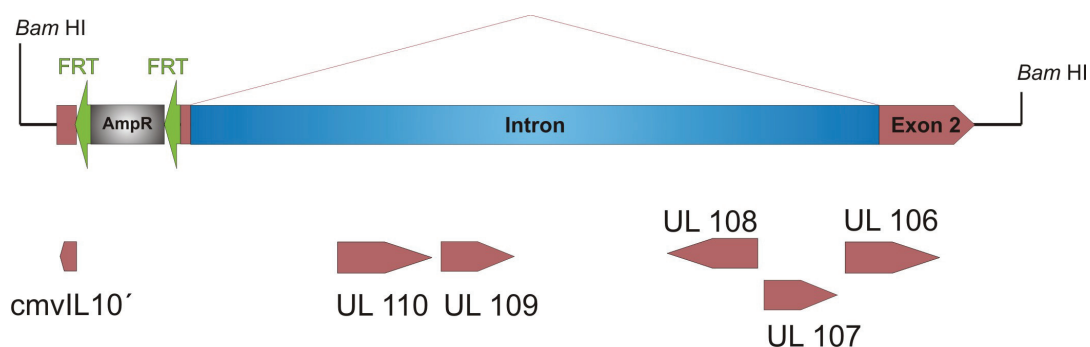


Abb. 3.29:

Schematische Übersicht des IE4-Bereichs der Mutante RV-KK-5. Der Bereich vom ersten Startcodon bis zum letzten alternativen Startcodon in Exon 3 wurde durch eine AmpR-Kassette ersetzt. Dabei wurde die erste der IE2-Bindestellen des UL112/113-Promotors deletiert.

dem letzten alternativen Startcodon im ORF UL111a (Exon 3, GTG) durch eine AmpR-Kassette ersetzt (Abb. 3.29). Aus dem BACmid pBAC-KK-5 wurde das Virus RV-KK-5 rekonstituiert und auf seine Replikationsfähigkeit hin überprüft.

3.4.2. Strukturelle Analyse der BAC-Mutanten

Restriktionsanalyse

Zur Überprüfung ihrer strukturellen Integrität wurden die verschiedenen HCMV-BACmide mit *Hind*III gespalten und durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Die erwarteten Restriktionsfragmente wurden mit Hilfe der Software „CloneManager 7.0“ bestimmt. Die untersuchten BACmide zeigten keine größeren Unterschiede in ihrem Bandenmuster im Vergleich zu pHB5 und wiesen somit keine unerwarteten strukturellen Veränderungen auf (Abb. 3.30).

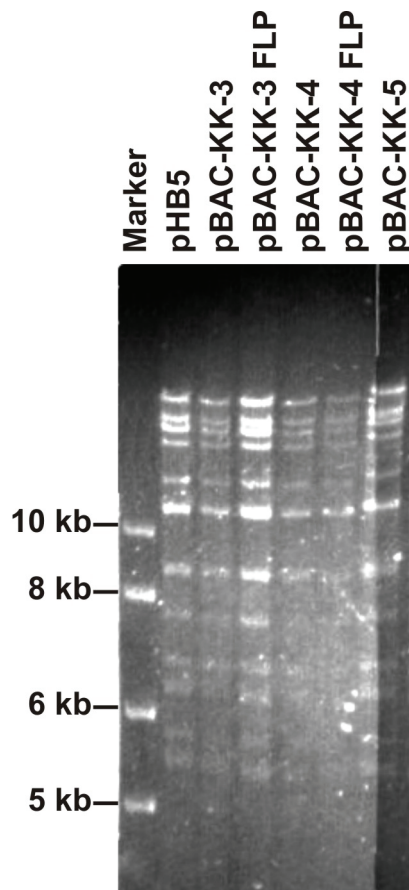


Abb. 3.30:

Restriktionsanalyse der BACmide pBAC-KK-3, pBAC-3 FLP, pBAC-KK-4, pBAC-4 FLP und pBAC-KK-5 im Vergleich zum BACmid des Laborstamms RV-HB5 (pHB5). 10 µg BAC-DNA wurden mit der Restriktionsendonuklease *Hind*III behandelt und die entstandenen Fragmente elektrophoretisch auf einem 0,6 %igen Agarosegel für 48 h aufgetrennt.

Sequenzierung

Alle durch die gesetzten Mutationen verursachten Veränderungen beeinflussten Fragmente mit über 10 kb. Eine Verifikation der genetischen Veränderungen war daher mittels Gelelektrophorese nicht sicher möglich. Die korrekte Insertion und Deletion

innerhalb des IE4-Bereichs wurde daher durch DNA-Sequenzierung der Übergänge zwischen den verwendeten Resistenzkassetten und dem HCMV-Genom überprüft. Dazu wurden Verdünnungsausstriche der Bakterienklone angelegt und mittels Kolonie-PCR die gewünschten Bereiche aus einzelnen Klonen amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde aufgereinigt und anschließend durch einen kommerziellen Anbieter extern sequenziert. Die Sequenzanalyse verifizierte in allen Fällen die erwartete Modifikation des HCMV-Genoms.

Southern Blot Analyse

In einem weiteren Ansatz zur strukturellen Charakterisierung wurden Southern Blot Analysen mit einer AmpR-spezifischen Sonde durchgeführt.

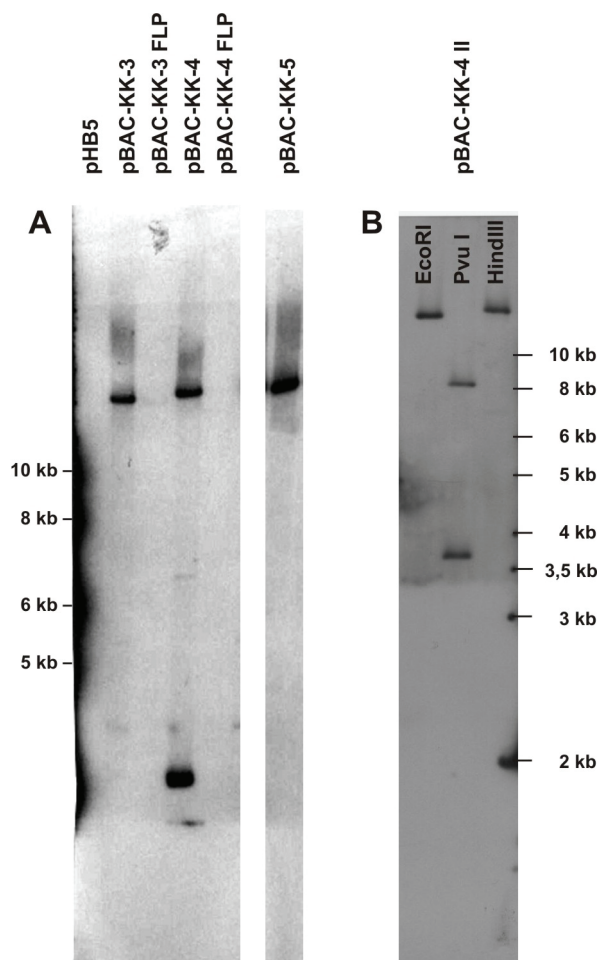


Abb. 3.31:

Southern Blot Analysen der BAC-Mutanten. 10 µg DNA der BACmide wurden mit den angegebenen Endonukleasen gespalten, elektrophoretisch aufgetrennt und in die Southern Blot Analyse eingesetzt. Die Hybridisierung erfolgte mit einer AmpR-spezifischen Sonde. **A)** Southern Blot Analyse mit *HindIII* verdauter DNA der angegebenen BACmide. Der Klon des BACmids pBAC-KK-4 weist mehrere Signale auf und wurde daher verworfen. **B)** Southern Blot Analyse von mit *HindIII*, *EcoRI* und *PvuI* gespaltenen DNA eines zweiten, im Rahmen dieser Arbeit weiter verwendeten BAC-Klons pBAC-KK-4 II.

Die Analyse der Mutanten pBAC-KK-3 und pBAC-KK-5 zeigte das erwartete Bandenmuster (Nachweis der Integration der Resistenzkassette). Demgegenüber hybridisierte die Sonde erwartungsgemäß nicht mit den BACmiden pBAC-KK-3 FLP und pBAC-KK-4 FLP (Nachweis der FLP-vermittelten Exzision der Resistenzkassette). Das

BACmid pBAC-KK-4 wies wider erwarten zwei Signale auf (Abb. 3.31 A). Aus diesem Grund wurde dieser Klon verworfen und durch einen zweiten unabhängig hergestellten Klon ersetzt. Dieser wies in einer Analyse mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen die erwarteten Signale auf und wurde weiter verwendet (Abb. 3.31 B). Aus diesem Klon wurde auch erneut das BACmid pBAC-KK-4 FLP hergestellt und mittels Restriktionsanalyse, Sequenzierung und Southern Blot untersucht und weiter verwendet.

Northern Blot Analyse

Die neu hergestellten Mutanten des HCMV wurden mittels Northern Blot hinsichtlich ihrer Transkription im IE4-Bereich analysiert. Hierzu wurde der Nachweis des stabilen Introns (5 kb RNA) des IE4-Transkripts mit Sonde #5 verwendet (Abb. 3.32).

In der Northern Blot Analyse zeigte das als Positivkontrolle verwendete Virus RV-HB5, das erwartete Signal des IE4-Introns (5 kb RNA). Die neuen IE4-Transkripte (Kap. 3.1.1) konnten aufgrund der geringen Laufzeiten der Gele nicht aufgetrennt werden. Die Analyse ergab auch für die Mutante RV-KK-1 und ihre Revertante RV-KK-2 die erwarteten Signale. Im Falle der Mutante RV-KK-1 konnte das IE4 Intron nicht mehr detektiert werden, während die Expression in der Revertante RV-KK-2 wieder hergestellt war. Ebenfalls wie erwartet konnte das Intron in den Mutanten RV-KK-4 und RV-4 FLP nicht mehr nachgewiesen werden. Die Mutanten RV-KK-3 und RV-3 FLP zeigten kein Signal der 5 kb RNA mehr. Im Falle der Mutante RV-3 FLP konnte jedoch eine RNA mit

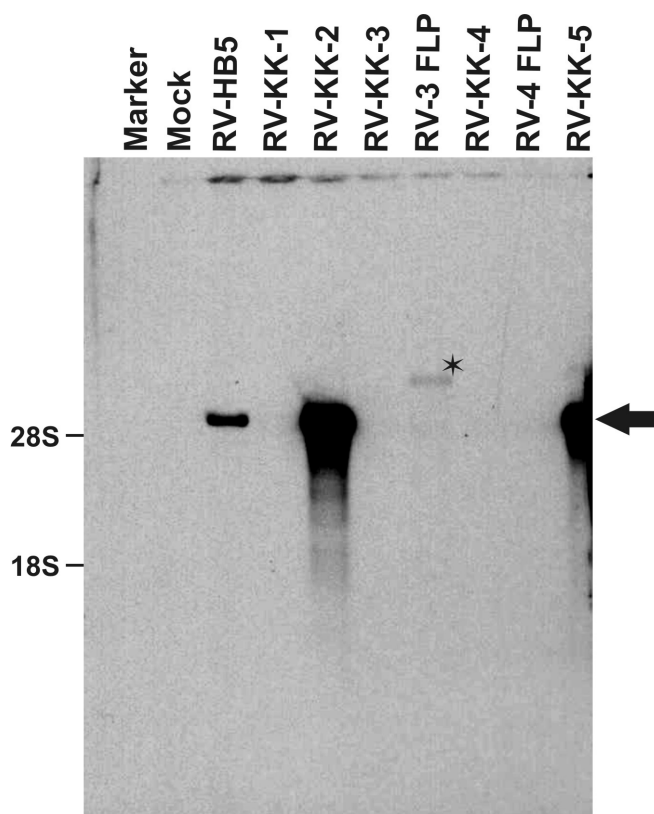


Abb. 3.32:

Northern Blot Analyse mit Sonde #5 der verwendeten BAC-Mutanten (10 min Belichtungszeit). 10 µg Gesamt-RNA aus infizierten HFF (5 d p.i.) wurden für 4 h aufgetrennt und in die Analyse eingesetzt. Der schwarze Pfeil markiert das Signal der 5 kb RNA. Der schwarze Stern zeigt die in RV-3 FLP detektierte größere RNA (~7 kb) an. Zum Größenvergleich wurden die Positionen der 28S (4718 nt) und 18S (1874 nt) rRNAs angegeben.

einer Größe von ungefähr 7 kb detektiert werden, deren Signal im Vergleich zum Laborstamm RV-HB5 deutlich schwächer war. Die veränderte Größe zeigte, dass der Spleißvorgang im IE4-Bereich wie erwartet verhindert wurde. Das in der Probe der Mutante RV-3 FLP gefundene größere Transkript stimmt mit der von Kulesza und Shenk (2004) beschriebenen Größenveränderung des IE4-Transkripts überein. Die Mutante RV-KK-5 zeigte eine mit dem Wildtyp und der Revertante vergleichbare Expression des IE4-Bereichs. Zusammenfassend zeigten die Analysen der BACmide die erwarteten Ergebnisse. Sie wurden in der Folge alle zur Rekonstitution der entsprechenden Virusmutanten eingesetzt und die daraus resultierenden Viren weiter charakterisiert.

3.4.3. Analyse der Replikationsfähigkeit der BAC-Mutanten

Zur Analyse der Replikationsfähigkeit der verschiedenen HCMV-Mutanten wurden so genannte „Multiple Cycle“-Wachstumsanalysen durchgeführt. Hierzu wurden HFF mit einer MOI von 0,001 mit den jeweiligen Viren infiziert und für einen Zeitraum von 16 Tagen inkubiert. In 48-stündigen Abständen wurden Proben des Zellkulturüberstandes entnommen und bis zur Analyse weggefroren. Zur Untersuchung wurden alle Proben gleichzeitig aufgetaut und die Anzahl viraler Partikel im Überstand, repräsentiert durch die Zahl viraler Genome, mittels TaqMan™-PCR bestimmt (Abb. 3.33 bis Abb. 3.36).

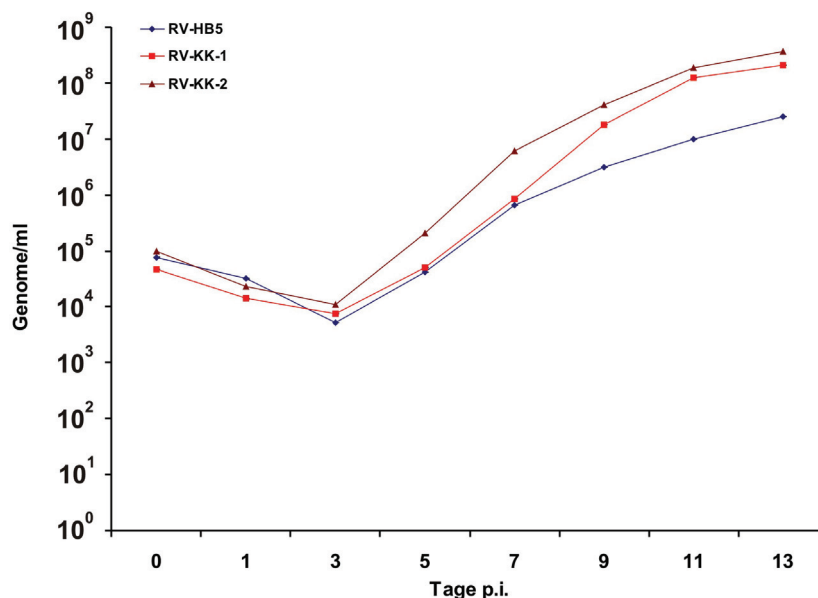


Abb. 3.33:

TaqMan™-PCR Analyse der Freisetzung viraler Genome aus Fibroblasten nach Infektion mit der Mutante RV-KK-1 und der Revertante RV-KK-2, sowie mit dem Ausgangsstamm RV-HB5. HFF wurden mit einer MOI von 0,001 infiziert und für 16 Tage inkubiert. Im 48 h Rhythmus wurde Zellkulturüberstand entnommen und in einer TaqMan™-PCR die Anzahl an viralen Genomen pro Milliliter Überstand gemessen.

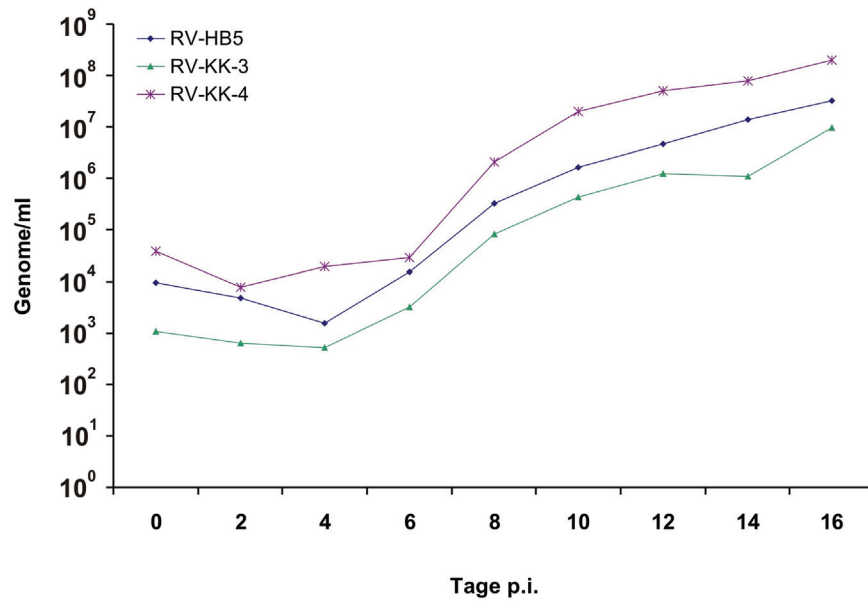


Abb. 3.34:

TaqMan™-PCR Analyse der Freisetzung viraler Genome aus Fibroblasten nach Infektion mit den Mutanten RV-KK-3 und RV-KK-4 im Vergleich zum Ausgangsstamm RV-HB5. HFF wurden mit einer MOI von 0,001 infiziert und wie in Abb. 3.33 beschrieben weiter behandelt.

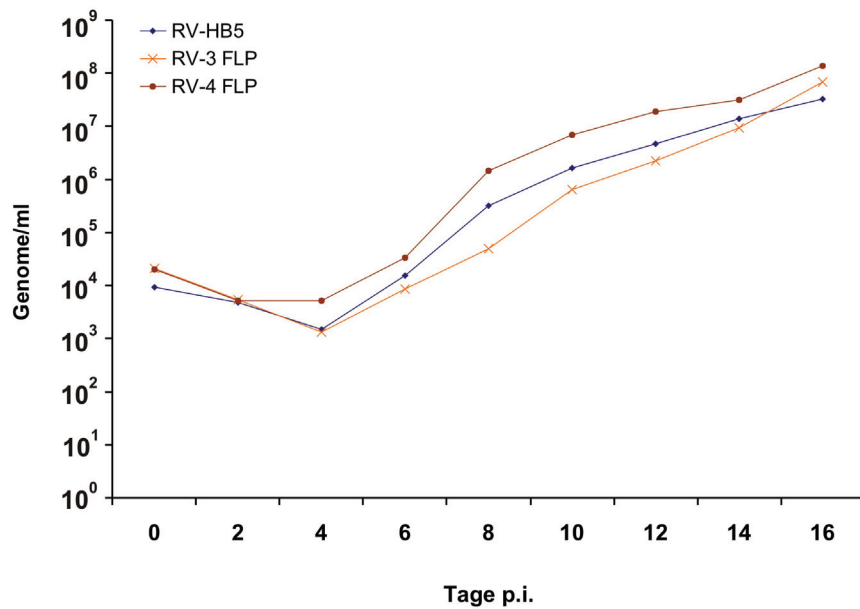


Abb. 3.35:

TaqMan™-PCR Analyse der Freisetzung viraler Genome der Mutanten RV-3 FLP und RV-4 FLP im Vergleich zum Ausgangsstamm RV-HB5. Versuchsdurchführung erfolgte wie in der Legende zu Abb. 3.33 dargestellt.

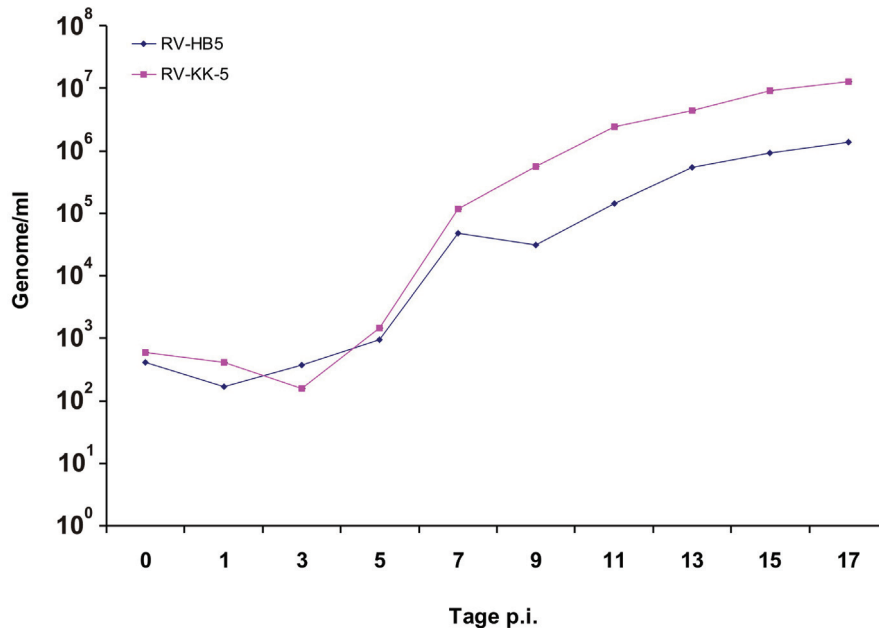


Abb. 3.36:

TaqMan™-PCR Analyse der Mutante RV-KK-5 im Vergleich zum Ausgangsstamm RV-HB5. Die Bestimmung der viralen Genomzahlen im Überstand erfolgte wie in Abb. 3.33 dargestellt.

Die Analyse der Replikation ergab, dass alle eingesetzten BAC-Mutanten ein zum Laborstamm RV-HB5 vergleichbares Replikationsverhalten zeigten. Die Viren RV-KK-1, RV-KK-2 und RV-KK-5 erreichten im Vergleich zu RV-HB5 sogar höhere Titer. Die mit RV-KK-3 auftretende scheinbar verringerte Replikationsfähigkeit lässt sich, wie die geringere Anzahl viraler Genome im Überstand zu diesem Zeitpunkt zeigt, durch eine geringere Infektion zum Zeitpunkt Null der Wachstumskinetik erklären (Abb. 3.34).

Zusammenfassend zeigten diese Analysen, dass das Replikationsdefizit der auf Ad169 basierenden Mutanten RVAdIE4-2 #129 und RVAdIL10 mit analogen Mutanten, die mittels BAC-Mutagenese in *E.coli* hergestellt worden waren, nicht reproduzierbar war.

3.4.4. Untersuchung der frühen Genexpression der BAC-Mutanten im Luciferase-Test

Zur Messung der Promotoraktivität wurden die in Kapitel 2.2.2 beschriebenen U373-Glioblastomzelllinien verwendet. Es wurden hierzu 1×10^5 dieser Zellen mit verschiedenen Infektionsstärken infiziert und 24 h p.i. lysiert. Die Luciferase-Aktivität des Zelllysats wurde bestimmt und dabei der Proteingehalt des Lysats zur Normierung herangezogen. Die Luciferase-Tests mit den BAC-Mutanten zeigten auch in wiederholten Ansätzen wider Erwarten keine Reduktion der Promotoraktivierung in infizierten Zellen. Mit keiner der eingesetzten BAC-Mutanten konnten die mit den auf

Ad169 basierenden Mutanten beobachteten Effekte reproduziert werden. Alle Mutanten zeigten Luciferase-Aktivitäten in einer zum Laborstamm RV-HB5 vergleichbaren Stärke (Abb. 3.37 und Abb. 3.38).

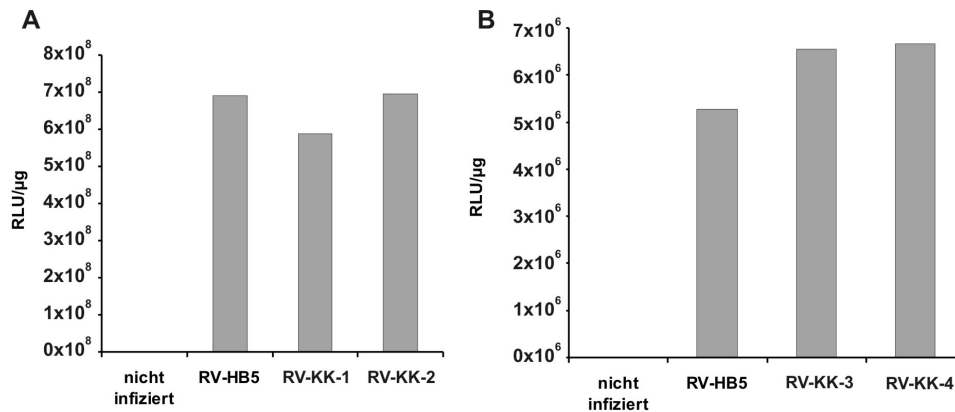


Abb. 3.37:

Luciferase-Test mit BAC-Mutanten im Vergleich zum Laborstamm RV-HB5. Es wurden 1×10^5 U373-UL112/113 Zellen infiziert (MOI 4) und 24 h p.i. die Luciferase-Aktivität in RLU (relative light units) / µg Gesamt-Protein gemessen. **A)** Luciferase-Test mit RV-KK-1 und der Revertante RV-KK-2 **B)** Luciferase-Test mit den Mutanten RV-KK-3 und RV-KK-4.

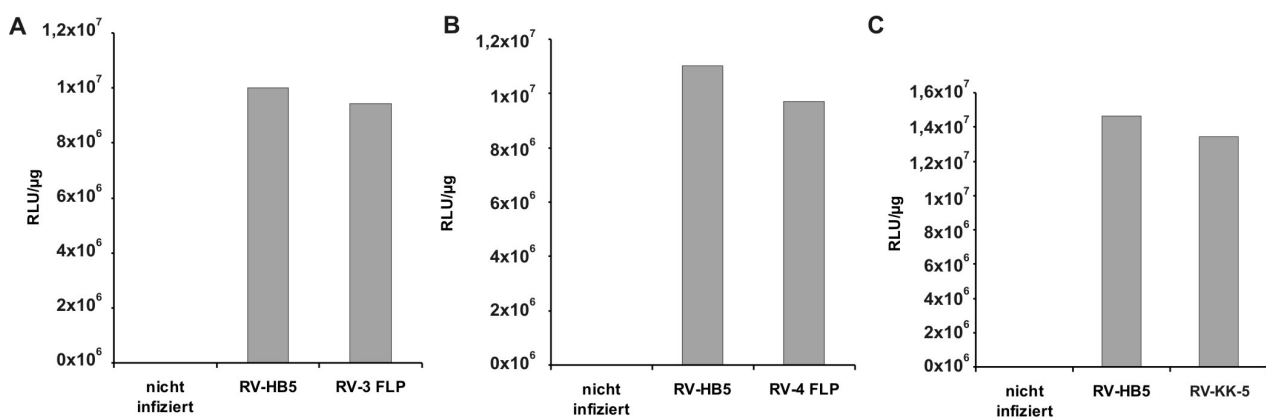


Abb. 3.38:

Bestimmung der Luciferase-Aktivität der mit den angegebenen BAC-Mutanten infizierten U373-Zellen im Vergleich zum Laborstamm RV-HB5. 1×10^5 U373-UL112/113 Zellen wurden mit den BAC-Mutanten RV-3 FLP (**A**), RV-4 FLP (**B**) und RV-KK-5 (**C**) infiziert und 24 h p.i. die Luciferase-Aktivität des Zelllysats in RLU/µg Gesamt-Protein bestimmt.

Dies galt in gleichem Maße für beide untersuchten Promotoren UL97 und UL112/113 (Abb. 3.39). Ein Vergleich der Luciferase-Aktivität zwischen den Laborstämmen Ad169 und RV-HB5 ergab jedoch einen deutlichen Unterschied zwischen diesen Viren. Mit Ad169 infizierte Zellen wiesen eine deutlich geringere Luciferase-Aktivität als mit RV-HB5 infizierte Zellen auf. Wurden in einem Experiment gleiche Infektionsstärken

eingesetzt, konnte eine bis zu 8x geringere Luciferase-Aktivität mit Ad169 infizierten Zellen gemessen werden. Dies konnte sowohl mit infizierten U373-UL97 Zellen (Abb. 3.39 B) als auch in gleichem Maße mit infizierten U373-UL112/113 Zellen gezeigt werden (Abb. 3.39 C).

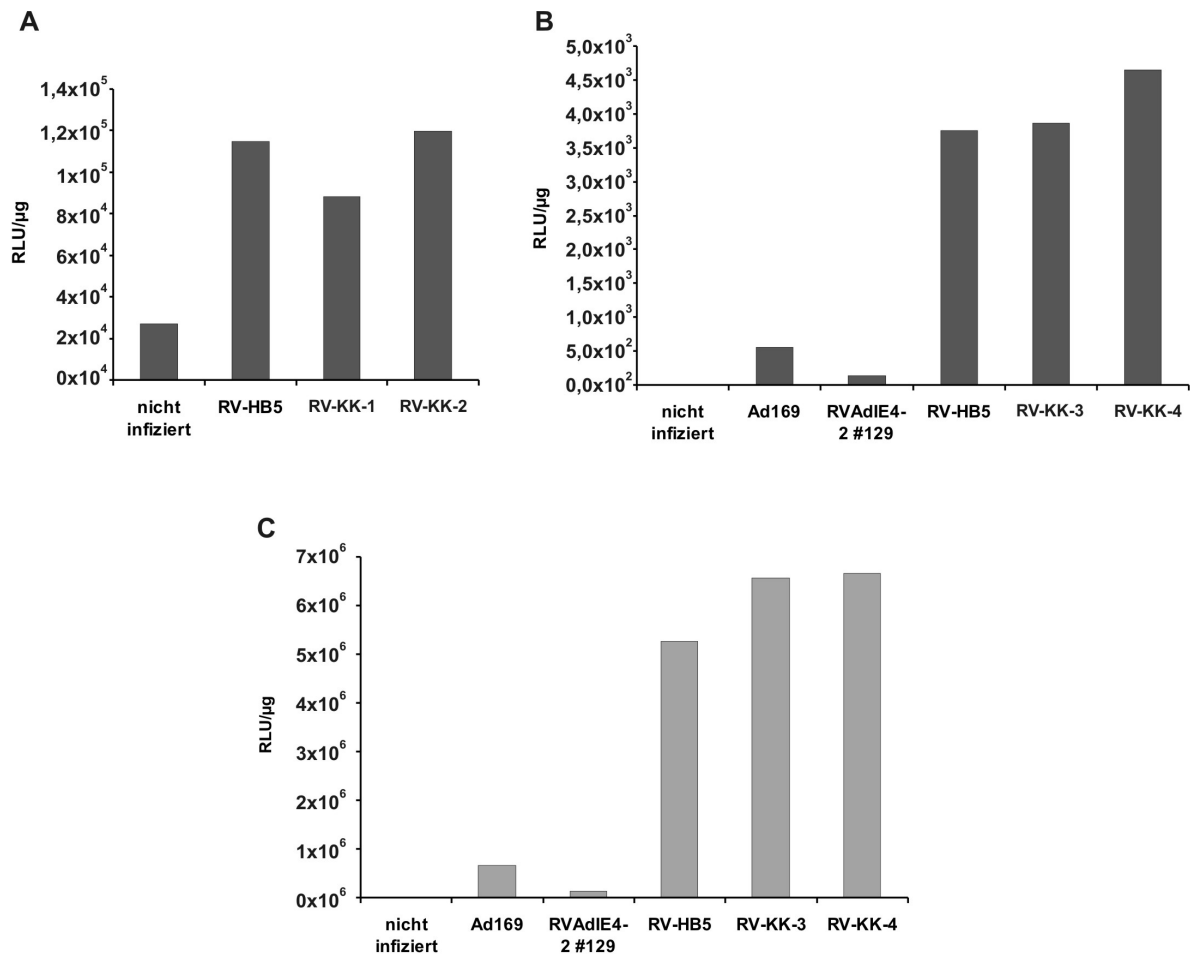


Abb. 3.39:

Luciferase-Test mit infizierten U373-Zellen. Es wurden 1×10^5 Zellen infiziert (MOI 4) und 24 h nach der Infektion die Luciferase-Aktivität in RLU (relative light units)/µg Gesamt-Protein gemessen. **A)** Luciferase-Test mit der BAC-Mutante RV-KK-1 und der Revertante RV-KK-2 im Vergleich zu RV-HB5 in U373-UL97 Zellen. **B)** Luciferase-Test mit den BAC-Mutanten RV-KK-3 und RV-KK-4 im Vergleich zu RV-HB5 in U373-UL97 Zellen. Zum Vergleich wurden parallel Zellen mit der Mutante RVAdIE4-2 #129 infiziert und im Vergleich zum Laborstamm Ad169 gemessen. **C)** U373-UL112/113 Zellen infiziert mit den Mutanten RV-KK-3 und RV-KK-4 im Vergleich zu RV-HB5. Parallel wurde die Mutante RVAdIE4-2 #129 im Vergleich zu Ad169 getestet.

Zur Verifikation des fehlenden Phänotyps der durch BAC-Mutagenese hergestellten Mutanten, wurden alle Arbeitsschritte zur Herstellung der Mutanten RV-3 FLP und RV-4 FLP nochmals wiederholt, um eine zweite unabhängig generierte Gruppe von BAC-Mutanten zu erhalten. Die Mutanten RV-3 FLP II und RV-4 FLP II wurden durch Restriktions- und Southern Blot-Analysen charakterisiert (Daten nicht gezeigt). Die

Aktivierung früher Gene wurde beispielhaft an der Aktivierung des UL112/113-Promotors durch die Mutanten RV-4 FLP II und RV-3 FLP II im Vergleich zum Laborstamm RV-HB5 in Luciferase-Tests untersucht (Abb. 3.40).

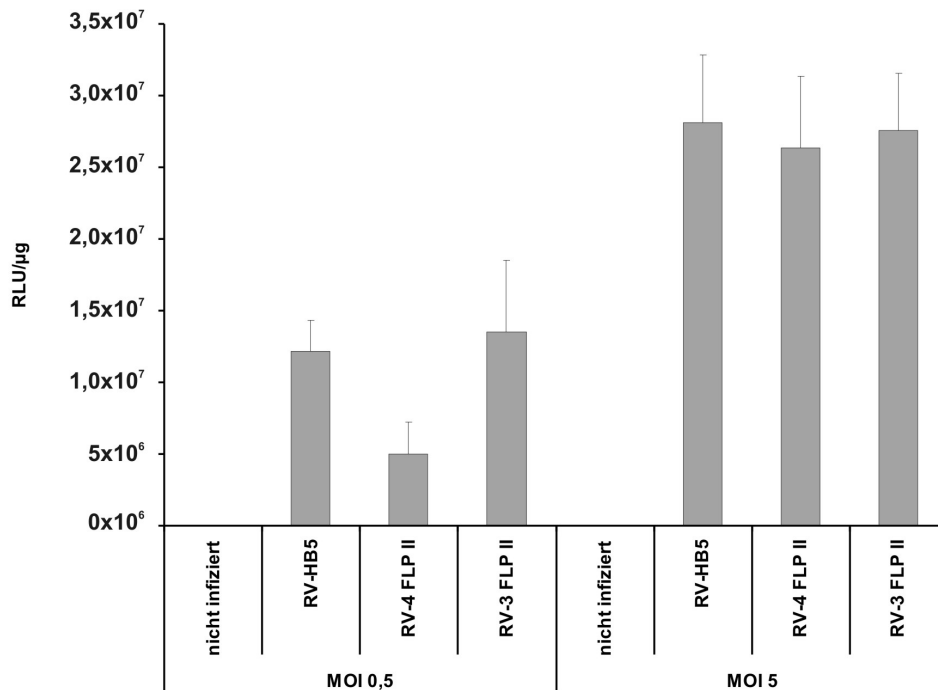


Abb. 3.40:

Luciferase-Test mit den unabhängig generierten Mutanten RV-4 FLP II und RV-3 FLP II im Vergleich zum Laborstamm RV-HB5. Es wurden 1×10^5 Zellen infiziert (MOI 5 und MOI 0,5) und 24 h p.i. in den Luciferase-Test eingesetzt. Die Luciferase-Aktivität des Lysats wurde bestimmt und auf die Gesamt-Proteinmenge normiert. Gezeigt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten, Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

Die Untersuchung der Luciferase-Aktivität der unabhängig generierten Mutanten RV-3 FLP II und RV-4 FLP II ergab keine Unterschiede im Vergleich zum Laborstamm RV-HB5, wenn hohe Infektionsstärken verwendet wurden (MOI 5). Wider Erwarten konnte mit der Mutante RV-4 FLP II jedoch wiederholt bei einer niedrigen MOI von 0,5 eine Reduktion der Luciferase-Aktivität im Vergleich zu RV-HB5 beobachtet werden, während die Mutante RV-3 FLP II keine Reduktion der Luciferase-Aktivität zeigte. Eine daraufhin durchgeführte Analyse der UL112/113 Promotoraktivität mit der Vorstufe der Mutante RV-4 FLP II ohne FLP-Rekombinase-Schritt (RV-KK-4 II) zeigte keine Unterschiede zum Laborstamm RV-HB5 (Daten nicht gezeigt). Daher wird angenommen, dass es während der FLP-Rekombination zu Veränderungen im Genom der Mutante RV-4 FLP II kam, die für den beobachteten Phänotyp verantwortlich sind.

3.4.5. Quantitative Analyse der Genexpression in infizierten HFF mittels *Real-Time* RT-PCR

Um die Ergebnisse der Luciferase-Tests in einem unabhängigen experimentellen System zu bestätigen, wurde die Genexpression der Mutanten RV-KK-1, RV-3 FLP I, RV-4 FLP I, RV-4 FLP II und RV-KK-5 weiter mit Hilfe der *Real-Time* RT-PCR im Vergleich zum Laborstamm RV-HB5 untersucht. Die Genomnormierung (Kap. 2.6.13) mittels TaqMan™-PCR ergab, dass alle BAC-Mutanten und der Laborstamm RV-HB5 mit einer MOI von 0,5 eingesetzt werden konnten, um vergleichbare Mengen an viralen Genomen pro Zelle zu liefern (Abb. 3.41).

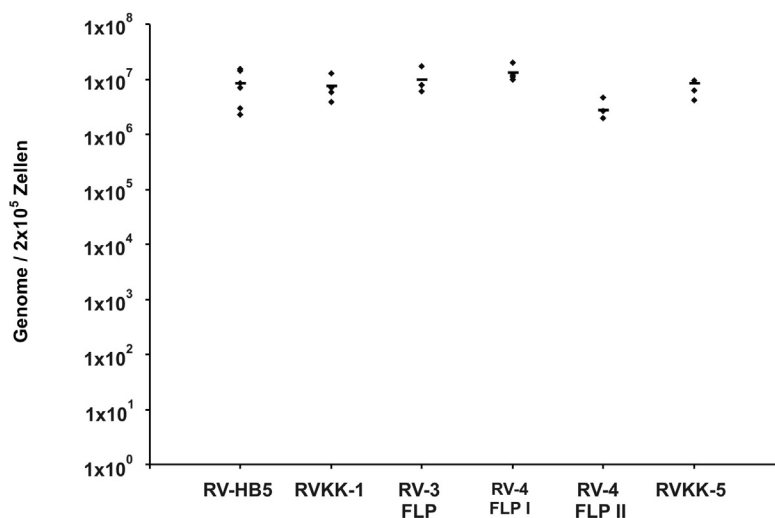


Abb. 3.41:

Genomnormierung der BAC-Mutanten für die *Real-Time* RT-PCR. Intrazelluläre virale Genome wurden 12 h p.i. aus 2×10^5 Zellen isoliert und mit Hilfe einer TaqMan™-PCR absolut quantifiziert.

Es wurden 5×10^5 HFF mit den verwendeten BAC-Mutanten und dem Laborstamm RV-HB5 mit einer MOI von 0,5 infiziert, 24 h p.i. aus 2×10^5 Zellen die Gesamt-RNA isoliert, während parallel dazu aus 2×10^5 Zellen die viralen Genome zur Überprüfung der Genomnormierung gewonnen wurden. Die isolierte RNA wurde in die *Real-Time* RT-PCR eingesetzt und der relative Anteil der zu untersuchenden Transkripte an der Gesamt-RNA im Bezug auf den Laborstamm RV-HB5 bestimmt (Kap. 3.2.5), wobei die Gene UL112/113 und UL4 wie bereits beschrieben (Kap. 3.2.3) in einem parallelen Ansatz analysiert wurden.

Da in der Genomnormierung Schwankungen der intrazellulären Genomzahlen von einem Faktor 1,5x gemessen werden konnten (Kap. 3.2.5), wurden nur Änderungen der Transkriptmengen über einem Faktor von 1,5x als signifikant angesehen. Eine Änderung der Transkriptmenge von 1,5x entspricht einem Wert von 0,2 Log₁₀ der Relativen Quantität (RQ). Es wurde daher ein Intervall von +0,2/ -0,2 RQ definiert, innerhalb dessen Änderungen der Transkriptmenge als nicht signifikant angesehen wurden.

Analyse der Mutante RV-KK-1

Die Mutante RV-KK-1 entspricht in ihrer Deletion genau der auf Ad169 basierenden Mutante RVAdIE4-2 #129, die eine deutliche Reduktion der frühen Genexpression gezeigt hatte (Kap. 3.2.3). Dieser Phänotyp konnte mit der Mutante RV-KK-1 nicht reproduziert werden. Die Gene IE2, UL44, UL54 und UL97 der Mutante zeigten in beiden Experimenten eine stärkere Aktivität im Vergleich zum Laborstamm RV-HB5. Im Falle der Gene IE2 und UL97 lag diese Steigerung in beiden Experimenten I und II über der Grenze von +0,2 RQ. Nur das Gen US11 zeigte eine Tendenz zur geringeren Genaktivität, die Relative Quantität lag jedoch nur in einem Experiment über der Intervallgrenze (Abb. 3.42), während sich die Aktivität der Gene IE1, UL4 und UL112/113 im Vergleich zu RV-HB5 nicht reproduzierbar veränderte.

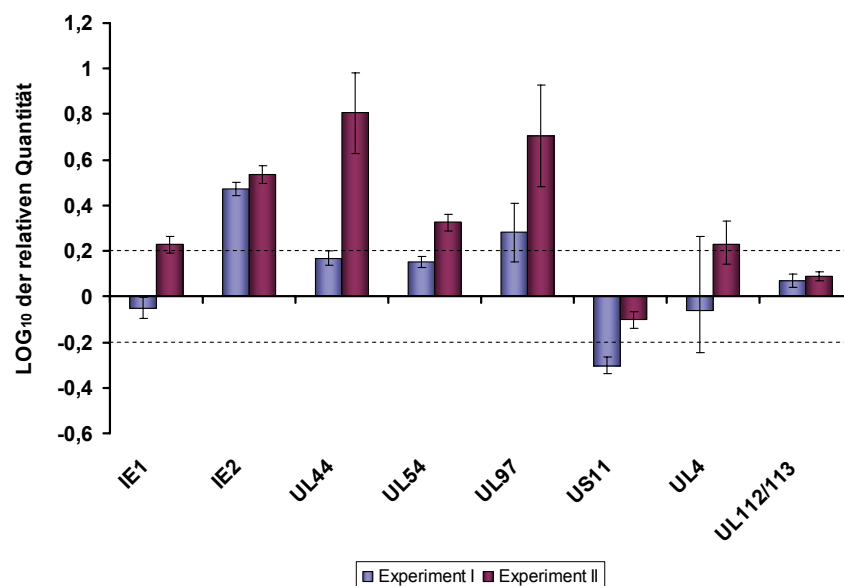


Abb. 3.42:

Relative Quantifizierung der Genexpression der Mutante RV-KK-1 im Vergleich zum Laborstamm RV-HB5. Gesamt-RNA (50 ng) wurde aus infizierten HFF 24 h p.i. isoliert und in die *Real-Time* RT-PCR eingesetzt. Es wurden jeweils Triplets gemessen und das Experiment mit einer zweiten unabhängigen RNA-Isolation wiederholt. Die Fehlerbalken beruhen auf den jeweiligen RQ_{max} und RQ_{min} Werten. Das Intervall -0,2 / +0,2 LOG₁₀ relative Quantität legt den Bereich der durch die Infektion bedingten Hintergrundschwankung fest und nur RQ-Werte außerhalb dieses Intervalls wurden als Änderungen der Transkriptmenge betrachtet.

Analyse der Mutante RV-3 FLP

Der in der Mutante RV-3 FLP deletierte Bereich entsprach dem der von Kulesza und Shenk (2004) beschriebenen Spleiß-Donor Mutante. Die Mutante RV-3 FLP zeigte ebenfalls keine Reduktion der frühen Genexpression, trotz der in beiden Experimenten detektierten Reduktion der Aktivität des Gens IE2 (Abb. 3.43), das einen essentiellen Transaktivator der frühen Genexpression darstellt (Mocarski-ES *et al.*, 2007). Die Gene UL44 und UL97 zeigten beide eine höhere Aktivität im Vergleich zum Wildtyp, die jedoch nur im Fall des Gens UL97 in beiden Experimenten nachgewiesen werden konnte. Die Gene IE1, UL54, US11, UL4 und UL112/113 zeigten keine reproduzierbaren Unterschiede im Vergleich zu RV-HB5.

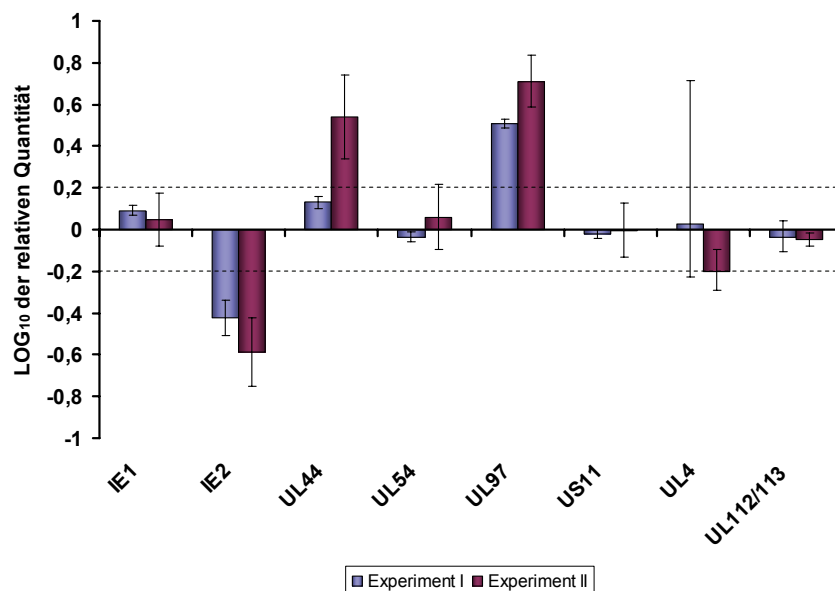


Abb. 3.43:

Relative Quantifizierung der Genexpression der Mutante RV-3 FLP im Vergleich zum Laborstamm RV-HB5. Gesamt-RNA aus infizierten HFF wurde wie in Abb. 3.42 beschrieben isoliert und in die *Real-Time* RT-PCR eingesetzt.

Analyse der Mutanten RV-4 FLP I und RV-4 FLP II

In den Mutanten RV-4 FLP I und RV-4 FLP II wurde die vollständige Intronsequenz deletiert. Im Falle der Mutante RV-4 FLP I zeigten die Gene IE1, UL44, UL54 und UL97 eine stärkere Genaktivität im Vergleich zum Laborstamm RV-HB5, die jedoch nur für die Gene UL44 und UL97 im zweiten unabhängigen Experiment reproduziert werden konnte. Die Gene, IE2, US11, UL4 und UL112/113 zeigten keine Unterschiede in der Genaktivität außerhalb der Intervallgrenzen (Abb. 3.44).

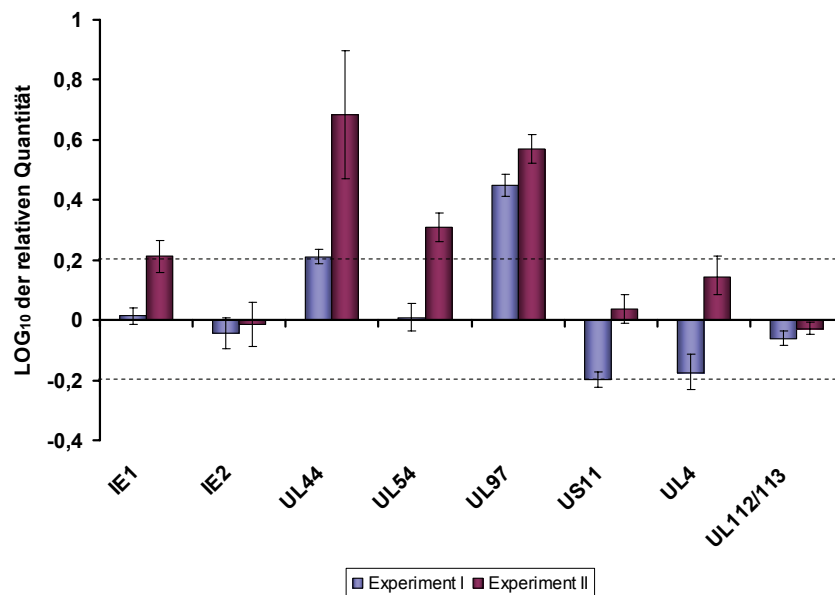


Abb. 3.44:

Relative Quantifizierung der Genexpression der Mutante RV-4 FLP I mittels *Real-Time* RT-PCR. Die Durchführung des Experiments erfolgte wie in Abb. 3.42 beschrieben.

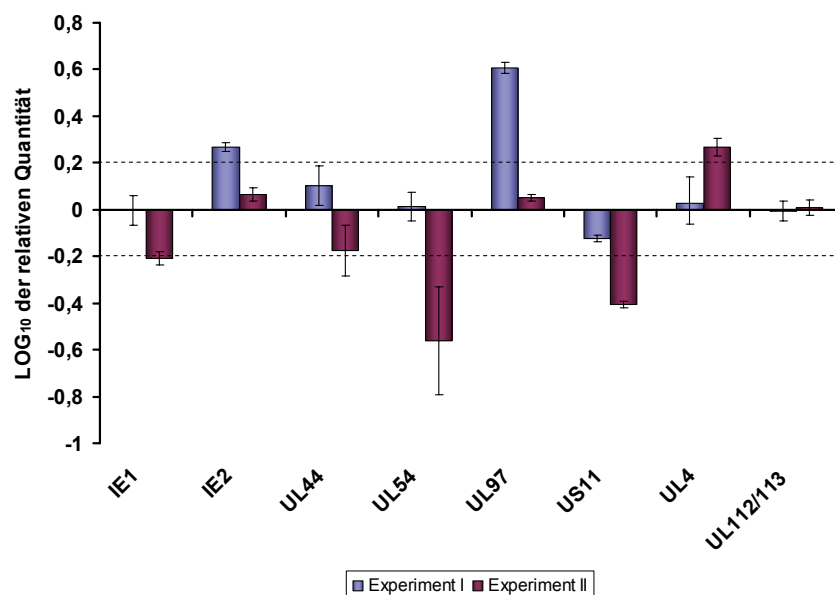


Abb. 3.45:

Relative Quantifizierung der Genexpression der Mutante RV-4 FLP II im Vergleich zum Laborstamm RV-HB5. Gesamt-RNA wurde aus infizierten HFF 24 h p.i. isoliert und wie in Abb. 3.42 beschrieben in die *Real-Time* RT-PCR eingesetzt.

Die Mutante RV-4 FLP II zeigte im Luciferase-Test im Gegensatz zur Mutante RV-4 FLP I eine 2-3x Reduktion der UL112/113-Promotoraktivität (Abb. 3.45). Die relative Quantifizierung der untersuchten Transkripte konnte diesen Phänotyp jedoch nicht reproduzieren. Die Gene UL112/113 und UL44 zeigten in beiden Experimenten

keine signifikante Veränderung der Transkriptmenge. Für die Gene IE2, UL54, US11, UL97 und UL4 konnten zwar Änderungen der Genaktivität gemessen werden, diese waren jedoch nicht reproduzierbar. Wie bereits bei der Analyse der Mutante RVAdIE4-1 #7 beobachtet wurde, sind die *Real-Time* RT-PCR-Bedingungen nicht ausreichend optimiert, um im Luciferase-Test gemessene Unterschiede einer 2-3x Reduktion der Promotoraktivität reproduzierbar detektieren zu können. Daher konnten mit der Mutante RV-4 FLP II trotz der verringerten Luciferase-Aktivität keine reproduzierbaren Unterschiede der Genexpression in der *Real-Time* RT-PCR gemessen werden.

Analyse der Mutante RV-KK-5

Die Deletion der Mutante RV-KK-5 erstreckte sich über den größten Teil des *cmvIL10*-Gens (Kotenko *et al.*, 2000). Im Falle der Mutante RV-KK-5 konnten für die Gene IE1, UL44, UL54, UL97, US11 und UL4 Veränderungen der Genaktivität gemessen werden, die jedoch nur für UL97 auch in beiden Experimenten reproduziert werden konnten. Das IE2-Gen zeigte in beiden Experimenten eine verringerte Expression, die in beiden Experimenten unterhalb der Intervallgrenzen lag. Für das UL112/113-Gen konnte in beiden Experimenten eine erhöhte Expression detektiert werden, die jedoch immer unterhalb der Intervallgrenzen blieb (Abb. 3.46).

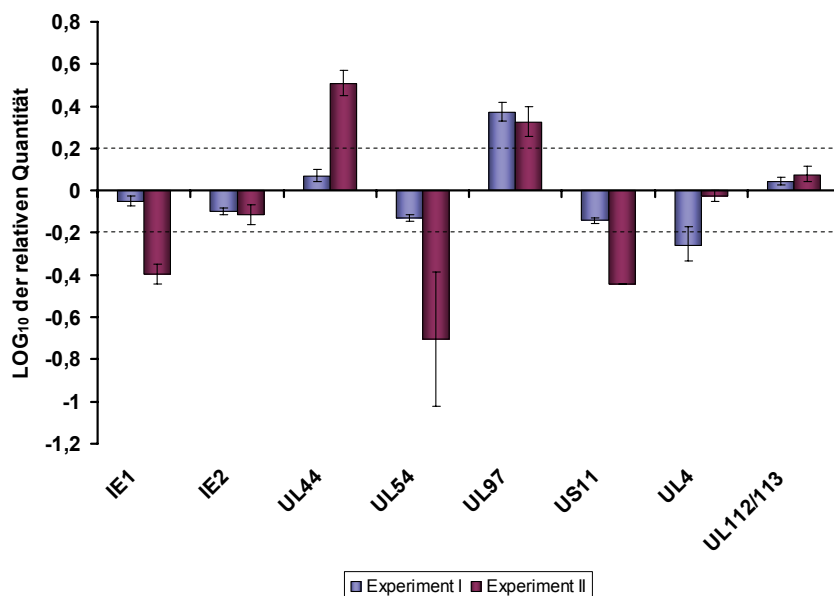


Abb. 3.46:

Relative Quantifizierung der Genexpression der Mutante RV-KK-5 im Vergleich zum Laborstamm RV-HB5. Die Durchführung der *Real-Time* RT-PCR erfolgte wie in Abb. 3.42 beschrieben.

Die Analyse der Genexpression der BAC-Mutanten ergab keinen eindeutig reproduzierbaren Phänotyp der untersuchten Viren. Die gemessenen Veränderungen der Transkriptionsaktivität der untersuchten Gene konnte in den meisten Fällen nicht reproduziert werden. Eine Ausnahme stellte das Gen UL97 dar. Dieses Gen wurde in allen Mutanten im Vergleich zu RV-HB5 verstärkt transkribiert.

3.4.6. Vergleich der IE1/IE2 Expression in RV-HB5 und Ad169

Die Einschränkungen der frühen Genexpression nach Infektion mit den Mutanten RVAdIE4-1 #7, RVAdIE4-2 #129 bzw. RVTbIE4 #29 konnten mit den BAC-Mutanten nicht reproduziert werden. Eine mögliche Erklärung hierfür waren eventuelle Unterschiede in der Expressionsstärke der viralen Transaktivatoren IE1 und IE2 zwischen Ad169 und RV-HB5. IE1 und IE2 sind bekannter Maßen für die Aktivierung der frühen Genexpression essentiell (zusammengefasst in (Mocarski-ES *et al.*, 2007)). Um Unterschiede in der Expression der beiden *immediate-early* Gene IE1 und IE2 möglichst genau zu bestimmen, wurden die IE1 und IE2 Transkripte in infizierten HFF mit Hilfe der *Real-Time* RT-PCR absolut quantifiziert. Im Gegensatz zur relativen Quantifizierung kann durch die Verwendung von externen Standards mit dieser Methode eine weitaus größere Genauigkeit und Reproduzierbarkeit erreicht werden. Dazu wurden 5×10^5 HFF infiziert und die Zellen 8 h p.i. geerntet. Aus jeweils 2×10^5 Zellen wurden zum einen die intrazellulären viralen Genome, zum anderen Gesamt-RNA isoliert. Die Zahl der intrazellulären Genome wurde mit Hilfe der TaqMan™-PCR bestimmt. Die Anzahl der IE1 und IE2 Transkripte wurde mittels SYBR-GREEN *Real-Time* RT-PCR absolut quantifiziert und im Anschluss die Zahl der Transkripte pro viralem Genom sowohl für Ad169 wie auch für RV-HB5 berechnet (Abb 3.47). Der Vergleich der IE1 und IE2 Expression zwischen den beiden verwendeten Laborstämmen Ad169 und RV-HB5 ergab

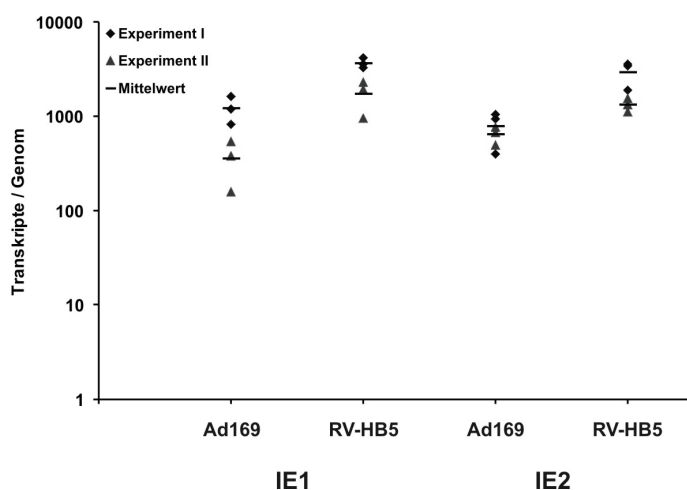


Abb. 3.47:

Absolute Quantifizierung der IE1 und IE2 Transkripte pro viralem Genom in infizierten HFF. 5×10^5 Zellen wurden infiziert (MOI 0,5) und 8 h p.i. in parallelen Ansätzen aus 2×10^5 Zellen sowohl die intrazellulären Genome wie die zelluläre Gesamt-RNA isoliert. Die Genomzahl wurde mittels TaqMan™-PCR quantifiziert und die Transkripte mittels *Real-Time* RT-PCR absolut quantifiziert. Es sind Triplets zweier unabhängiger Experimente dargestellt

eine im Mittel 3,9x höhere Expression des IE1 Gens in RV-HB5 im Vergleich zu Ad169. Die Expression des IE2-Gens war im Mittel 2,9x höher im Stamm RV-HB5 verglichen mit Ad169. Diese Aussagen wurden mit Hilfe eines Student'schen T-Tests überprüft und können jeweils mit einer Wahrscheinlichkeit von über 98% als richtig angenommen werden (einseitiger T-Test, $p_{H_0} \leq 0,02$). Um zu untersuchen, ob die in der *Real-Time* RT-PCR gefundenen Unterschiede auch auf Proteinebene reproduzierbar waren, wurde eine Western Blot Analyse mit infizierten HFF durchgeführt. Zum Nachweis der Proteine wurde Gesamt-Protein aus Lysaten infizierter Zellen mittels SDS-PAGE nach Molekulargewicht aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die IE1 und IE2 Proteine wurden anschließend mit Hilfe monoklonaler Antikörper detektiert. Zur Normierung der aufgetragenen Proteinmengen wurde ein Tubulin-spezifischer Antikörper verwendet. Der Vergleich der Signalstärken in der Western Blot Analyse zeigte, dass in RV-HB5 infizierten Zellen deutlich höhere Mengen des IE1 Proteins nachweisbar waren als Ad169 infizierten Zellen. Die Expression des IE2 Proteins war in Ad169-infizierten Zellen mit der gewählten Sensitivität nicht nachweisbar, wohingegen RV-HB5 infizierte Zellen deutlich mit dem IE2-spezifischen Antikörper reagierten (Abb. 3.48).

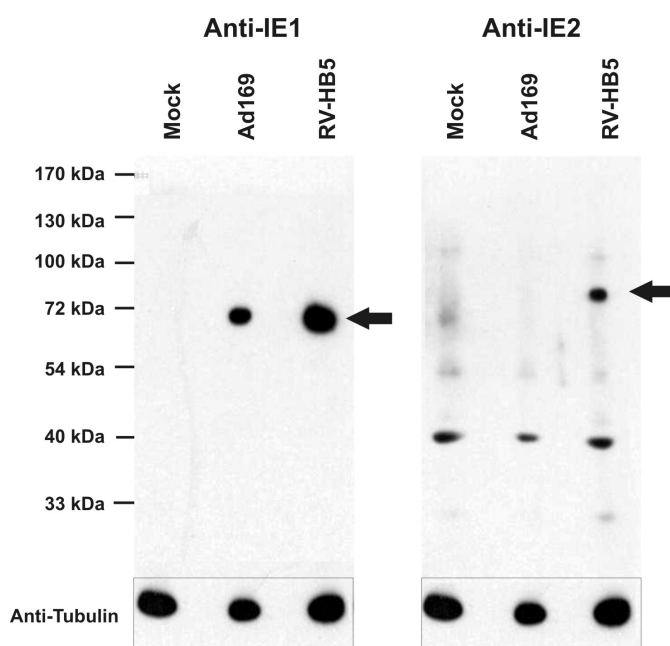


Abb. 3.48:

Western Blot Analyse mit infizierten HFF Zellen. 5×10^5 Zellen wurden infiziert (MOI 5). 48 h p.i. wurden die Zellen lysiert. 20 μ l des Lysats wurden in die Western Blot Analyse eingesetzt. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit Anti-IE1 (p63-27) bzw. Anti-IE2 (SMX) Antikörpern. Zur Normierung der aufgetragenen Proteinmengen wurde Tubulin herangezogen. Die schwarzen Pfeile markieren die Laufhöhen des IE1- (72 kDa) bzw. IE2-Proteins (86 kDa).

Diese Experimente zeigten, dass bei gleicher Infektionsstärke der Stamm Ad169 deutlich weniger IE-RNA und IE-Protein synthetisierte als der Stamm RV-HB5. Es ist vorstellbar, dass die höhere Abundanz von IE1- und IE2-Protein in RV-HB5 Abkömmlingen eventuell auftretende Beeinträchtigungen der frühen Genexpression durch die Deletion des IE4-Bereichs in der hier vorgelegten Untersuchung kompensiert hat. Es sind weiterführende Analysen notwendig, um diesen Sachverhalt aufzuklären.

4. Diskussion

Das HCMV ist ein häufiger, fakultativ pathogener Krankheitserreger, der vornehmlich bei eingeschränkter Immunabwehr schwerwiegende Erkrankungen hervorruft. Neben der herausragenden Bedeutung dieses Virus im Rahmen von kongenitalen Infektionen (Rowe *et al.*, 1956; SMITH, 1956), stellt seine Reaktivierung aus der Latenz eine lebensbedrohliche Komplikation bei der Transplantation von soliden Organen und hämatopoetischen Stammzellen (Hebart & Einsele, 2004; Streblow *et al.*, 2007), sowie bei AIDS Patienten dar (Mocarski-ES *et al.*, 2007). Die Genexpression des HCMV ist während des lytischen Replikationszyklus streng reguliert und folgt einer geordneten Aktivierungskaskade. Die Expression der *immediate-early* Genprodukte stellt einen entscheidenden ersten Schritt im viralen Replikationszyklus dar. Die Aktivierung aller nachgeschalteten E- und L-Gene ist in essentieller Weise von der Synthese der IE-Proteine abhängig (Meier & Stinski, 2006). Neben der Aktivierung der viralen Genexpression, beeinflussen IE-Genprodukte den Zellzyklus, blockieren die Apoptose der infizierten Zelle und behindern ihre Erkennung durch das Immunsystem (Mocarski-ES *et al.*, 2007).

Im Bereich des *HindIII*-E Fragments des HCMV-Genoms werden vier IE-Transkripte kodiert. Eines dieser Transkripte von etwa 5 kb wurde als IE4-Transkript bezeichnet und unterscheidet sich von allen anderen bislang untersuchten IE-RNAs durch seine ungewöhnliche Expressionskinetik. Es kann während des gesamten lytischen Zyklus in der infizierten Zelle nachgewiesen werden und reichert sich im Verlauf der Infektion an (Jahn *et al.*, 1984). Während dieses Transkript in früheren Arbeiten sowohl in PolyA⁺ wie auch in PolyA⁻ Fraktionen gereinigter RNA nachgewiesen wurde (Plachter *et al.*, 1988), konnte in einer aktuellen Arbeit das 5 kb Transkript fast ausschließlich in PolyA⁻ Fraktionen gefunden werden, wobei der hohe AT-Gehalt der 5 kb RNA als Ursache für die Detektion in PolyA⁺ Fraktionen angeführt wurde (Kulesza & Shenk, 2004). Die Analyse der Nukleotidsequenz des kodierenden DNA-Abschnitts konnte keinen längeren, durchgängigen ORF aufzeigen (Nelson *et al.*, 1984; Plachter *et al.*, 1988). Nachfolgende cDNA-Analysen führten zur genaueren Aufklärung der Struktur der IE4-RNA. Es zeigte sich, dass von der IE4-Genregion ein Primärtranskript abgelesen wird, das in eine RNA von 1,1 kb und ein Intron von 4,5 kb prozessiert wird (Rawlinson & Barrell, 1993). Die Sequenzanalyse der cDNA des 1,1 kb Transkripts führte jedoch erneut nicht zur Identifikation eines putativen ORF. Die Anordnung der Transkriptgrenzen dieser gespleißten RNAs legte nahe, dass es sich bei der 5 kb RNA um ein ungewöhnlich stabiles Intron des von Rawlinson und Barrell (1993)

beschriebenen primären Transkripts handelt. Systematische neuere Untersuchungen konnten schließlich zeigen, dass es sich bei dem als „IE4-RNA“ oder „5 kb RNA“ bezeichneten Transkript tatsächlich um ein Intron von 4,5 kb handelte, das im Vergleich zu anderen, eukaryonten Introns eine außergewöhnlich hohe metabolische Stabilität aufwies (Kulesza & Shenk, 2004).

Die Genomstruktur des IE4 Bereichs und die Expression der IE4-RNA ist zwischen verschiedenen HCMV-Laborstämmen und bei Primaten-CMV konserviert, eine 5 kb-RNA ist auch bei klinischen Isolaten nachweisbar (Nelson *et al.*, 1984; Plachter *et al.*, 1988; Murphy *et al.*, 2003b; Kulesza & Shenk, 2004). Auch bei murinem CMV konnte eine orthologe RNA von etwa 7,2 kb identifiziert werden (Kulesza & Shenk, 2006). Aufgrund ihrer Konserviertheit liegt die Vermutung nahe, dass diese Genomregion eine wichtige Rolle bei der Vermehrung von Cytomegaloviren spielt. Frühe Studien hatten Hinweise auf eine mögliche transformierende Aktivität dieses Genomabschnitts auf Säugerzellen, bzw. in Nacktmäusen erbracht (Nelson *et al.*, 1982), die jedoch einer genaueren Überprüfung nicht standhielten (Thompson *et al.*, 1994; Doniger *et al.*, 1999). Hinzu kommt, dass virale Mutanten, denen der IE4-Genomabschnitt fehlt in Fibroblasten keine Einschränkung ihrer Vermehrungsfähigkeit zeigten ((Pepperl, 2000; Pepperl-Klindworth *et al.*, 2006), diese Arbeit). In analoger Weise zeigen entsprechende Mutanten des MCMV keine Einschränkung ihrer Replikationsfähigkeit in Zellkultur (Kulesza & Shenk, 2006). Während IE4-Mutanten des MCMV ähnlich wie WT-Virus in Lunge, Leber, Milz und Nieren von infizierten Mäusen replizieren, zeigen sie jedoch erstaunlicher Weise eine deutlich eingeschränkte Vermehrungsfähigkeit in Speicheldrüsen. Die Gründe für diese verminderte Replikationsfähigkeit sind jedoch unklar.

Aufgrund der Konserviertheit und der starken Transkription im IE4-Genbereich liegt die Annahme nahe, dass diese Region einen für die Biologie des CMV wichtigen Stellenwert einnimmt. Die zunehmende Wahrnehmung der Bedeutung von nicht-kodierenden RNAs als regulative Faktoren (Storz, 2002) und die Entdeckung eines biologisch aktiven, stabilen Introns bei HSV-1 (Wu *et al.*, 1998; Perng *et al.*, 2000) führten dazu, dass auch der Untersuchung der biologischen Funktion des IE4-Transkripts von HCMV besonderes Interesse gewidmet wurde. Gegenstand dieser Arbeit sollte es daher sein, mögliche Genprodukte des IE4-Transkripts zu identifizieren und mit Hilfe von viralen Deletionsmutanten Hinweise auf die Bedeutung des Transkripts für die virale Genexpression und Replikation zu erhalten.

4.1. Identifizierung möglicher Genprodukte des IE4-Bereichs

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Northern Blot Analysen des IE4-Bereichs führten zur Identifikation von vier minoren, zuvor nicht beschriebenen Transkripten. Diese RNAs hybridisierten ausschließlich mit Sonden des Intronbereichs und kodierten auf dem gleichen Strang wie die 5 kb RNA. Vorangegangene Analysen einer Oligo-dT geprimten cDNA-Bank aus HCMV infizierten Zellen konnte keine RNAs identifizieren, die mit den hier gefundenen Transkripten in Verbindung gebracht werden konnten (Rawlinson & Barrell, 1993). Daher war zu vermuten, dass diese Transkripte keine PolyA⁺-RNAs und somit keine kodierenden mRNAs darstellten.

Zur weiteren Klärung wurden eigene cDNA-Analysen mit genspezifischen Primern von RNA Präparationen zu späten Zeitpunkten aus infizierten Zellen durchgeführt. Durch diese Untersuchungen konnte die bereits beschriebene gespleißte 1,1 kb RNA bestätigt werden (Rawlinson & Barrell, 1993). Gleichzeitig konnten cDNAs kloniert werden, die im Bereich des 3'-Endes der 5 kb RNA lokalisiert waren. Ein Vergleich mit der genomischen Sequenz dieses Abschnittes ergab, dass diese cDNAs interne Deletionen aufwiesen. Eine Entstehung dieser verkürzten cDNAs durch RNA-Sekundärstrukturen konnte in dieser Arbeit nicht vollständig ausgeschlossen werden, obwohl die cDNA-Synthese nach Angaben des Herstellers unter stringenten Bedingungen durchgeführt wurde um Sekundärstrukturen zu vermeiden (Korfhage *et al.*, 2000). Die Zugabe eines vom Hersteller zum Auflösen von RNA-Sekundärstrukturen empfohlenen Reaktionszusatzes hatte keinen Einfluss auf die Synthese der beschriebenen cDNAs (Qiagen Q-Solution, Daten nicht gezeigt). Eine bioinformatische Modellierung verschiedener möglicher Sekundärstrukturen des IE4-Primärtranskripts mit Hilfe des Computer-Programms „mfold v3.2“ (Mathews *et al.*, 1999; Zuker, 2003) ergab zwar ausgedehnte „Stem-Loop“-Strukturen im IE4-Bereich, jedoch keine, bei denen die 5'- und 3'-Grenzen der internen Deletionen proximal zueinander lagen.

Es liegt somit nahe, dass im 3'-Bereich der 5 kb RNA Transkripte kodieren, die durch alternative Spleißvorgänge aus dem Primärtranskript entstehen (Abb. 3.3). Die Sequenzanalyse der cDNAs ergab, dass bei allen Klonen der 3'-Bereich des putativen Exon-Exon Übergangs mit dem von Rawlinson und Barrell (1993) beschriebenen Spleiß-Akzeptor zusammenfiel. Die 5'-Grenzen der potentiellen Introns wurden jeweils durch ein Guanosin gebildet und lagen in Sequenzmotiven, die der Konsensussequenz eines Spleiß-Donors ähnelten (Tab. 3.2). Diese Erkenntnisse lassen alternative Spleißvorgänge als wahrscheinlichste Erklärung für den Nachweis verkürzter cDNAs in diesem Bereich erscheinen. Die Beschreibung neuer Transkripte und der alternativen

Spleißvorgänge im IE4-Bereich führte zu der Überlegung, dass die postulierten Spleißvorgänge im 3'-Bereich der IE4-RNA an der Entstehung dieser neuen Transkripte beteiligt sein könnten. Ein Modell der Vorgänge ist in Abb. 4.1 dargestellt. Bei einem einfachen alternativen Spleißen des primären IE4-Transkripts unter Beteiligung der neuen Spleißdonoren müssten jedoch große RNAs entstehen, in denen das Exon 1 und Teile des Introns mit dem Exon 2 verbunden werden (Abb. 4.1c, Zwischenprodukt). In den Northern Blot Analysen konnte jedoch mit den Sonden gegen Exon 1 und Exon 2 nur ein Signal im Bereich von ungefähr 1 kb detektiert werden. Die Tatsache, dass in den Northern Blot Analysen keine Transkripte gezeigt werden konnten, die sowohl mit Intron, als auch mit Exonsonden hybridisierten, macht deutlich, dass es sich bei der Entstehung dieser alternativen Transkripte um einen komplexeren Vorgang handeln muss. Dieser Vorgang kann nicht ausschließlich auf der Verwendung der beschriebenen alternativen Spleißdonoren beruhen, da diese eine Verbindung der Intronsequenz mit dem Exon 2 zur Folge hätte. Solche Produkte konnten in den Northern Blot Analysen nicht gezeigt werden. Auch enthielt die von Rawlinson und Barrell verwendete cDNA-Bank keines dieser Produkte, obwohl die weniger abundante 1,1 kb RNA in 3 von 100 Klonen nachgewiesen werden konnte (Rawlinson & Barrell, 1993). Dies alles deutet darauf hin, dass es sich bei den über die cDNA-Synthese gefundenen RNAs nicht um polyadenylierte Transkripte handelt.

Legt man einen Zusammenhang zwischen den neuen alternativen Spleißdonoren und den neuen Transkripten zugrunde, ließen sich die Ergebnisse der cDNA- und der Northern Blot- Analyse durch einen hypothetischen komplexen Spleißvorgang erklären. Dabei müsste man davon ausgehen, dass die neuen Transkripte über multiple, konsekutive Spleißvorgänge entstehen. Dabei würde zunächst einer der drei alternativen Spleiß-Donoren verwendet. Das daraus entstandene Zwischenprodukt enthielte immer noch beide Exons der 1,1 kb RNA und ein verkürztes Intron (Abb. 4.1c). Diese Zwischenprodukte würden dann in einer cDNA-Analyse zu den beobachteten cDNAs führen. Die Sequenzanalyse der cDNAs zeigte, dass die während dieses Spleißvorgangs entstandene Verbindungsstelle wieder das Kernmotiv eines Akzeptors (CAGGT) enthielte. Da die alternativen Donoren und der Akzeptor räumlich sehr nahe beieinander liegen, könnte dieses erste Spleißen sehr schnell erfolgen, das beteiligte Spleißosom dann abdiffundieren und das neu entstandene Akzeptormotiv erneut von Spleißfaktoren gebunden werden. Anschließend könnte dieser Akzeptor wieder für einen zweiten Spleißvorgang genutzt werden. In diesem zweiten Spleißvorgang würde dann unter der Verwendung des Spleißdonors D_1 das bereits beschriebene 1,1 kb Spleißprodukt des IE4-Transkripts entstehen und ein jeweils verkürztes Intron freigesetzt (Abb. 4.1c).

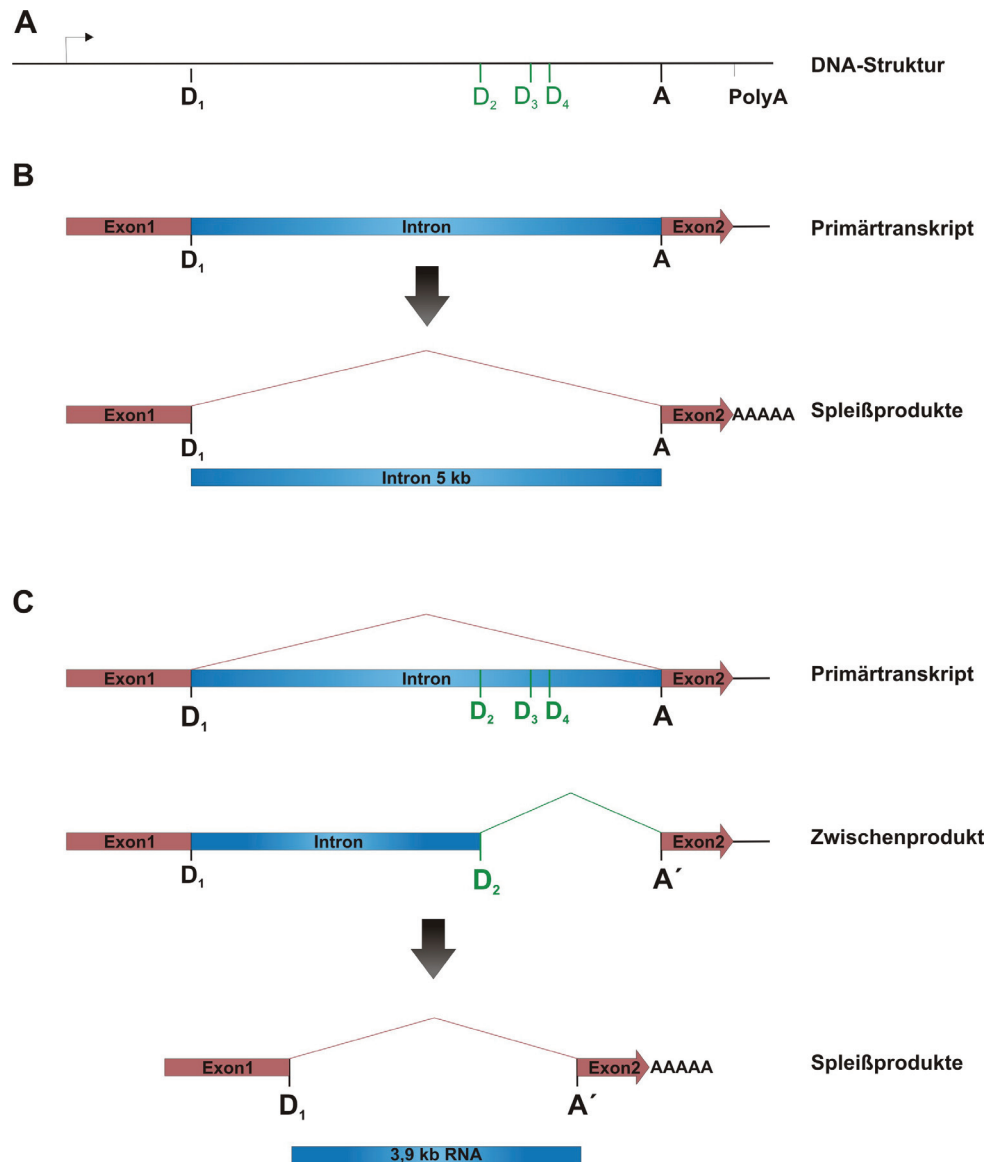


Abb. 4.1:

Darstellung der möglichen Spleißvorgänge im IE4-Bereich. **A**) Übersicht über die DNA-Struktur des IE4-Bereichs. Es sind die Positionen des Transkriptionsstarts (Pfeil), der Spleiß-Donoren (D_{1-4}), des Spleiß-Akzeptors (A) und des Polyadenylierungssignals (PolyA) eingezeichnet. **B**) Schematische Zeichnung des von Rawlinson und Barrell (1993) beschriebenen Spleißvorgangs, wobei unter Nutzung des Spleiß-Donors D_1 die 1,1 kb mRNA und das stabile 5 kb Intron entstehen. **C**) Darstellung des hypothetischen multiplen Spleißvorganges am Beispiel des Donors D_2 , der zur Bildung der drei neuen IE4-Transkripte führen könnte. Zunächst kommt es unter Verwendung eines der drei alternativen Donoren D_2 , D_3 oder D_4 zu einem Spleißvorgang, der zur Bildung eines verkürzten Zwischenprodukts mit dem neuen Akzeptor A' führt. Anschließend findet ein zweiter Spleißvorgang zwischen dem Donor D_1 und dem neuen Akzeptor A' statt, der zur Freisetzung der in der Northern Blot Analyse gefundenen neuen 3,9 kb, 4,2 kb und 4,7 kb IE4-RNAs führt.

Dieses Modell könnte zwar die Ergebnisse der Analyse verbinden, ist jedoch hoch spekulativ, da in der Literatur bisher keine mehrfache Verwendung eines Spleißdonors beschrieben wurde. Eine detailliertere Analyse der Spleißvorgänge wurde nicht vorgenommen, da auch bei diesen minoreren RNAs keine ORFs größer als 100 aa

identifiziert werden konnten und somit aus der weiterführenden Analyse auch keine zusätzlichen Erkenntnisse über die Funktion dieser Genomregion für die virale Vermehrung zu erwarten waren.

4.1.1. Heterologe Expression des IE4-Bereichs

Die transiente Expression des IE4-Genbereichs durch Transfektion des Plasmids pKK-IE4-Flag führte zum Nachweis eines Polypeptids mit einem Molekulargewicht < 10 kDa im Western Blot. Ein Protein dieser Größe wäre als Produkt der gespleißten RNA von 1,1 kb (Rawlinson & Barrell, 1993) zu erwarten und ein größeres Protein konnte nicht nachgewiesen werden. Die Aminosäuresequenz des Peptids zeigte in einer Datenbankanalyse keine signifikanten Homologien mit bekannten Peptiden oder Proteinen. Es ist unklar, ob ein analoges Polypeptid auch in der infizierten Zelle synthetisiert wird, da uns kein Antikörper zum Nachweis zur Verfügung stand. Die Western Blot Ergebnisse stimmen jedoch gut mit den Ergebnissen der Northern Blot Analysen aus infizierten Zellen überein (Abb. 3.5). Es konnten dort nur RNAs im Größenbereich von 1,1 kb identifiziert werden, die ausschließlich mit den Exonsonden IE4-1 und IE4-2 hybridisierten. Es konnten demnach keine größeren Transkripte nachgewiesen werden, die Exon 1 enthielten und zur Synthese größerer Proteine hätten führen können. Diese Ergebnisse werden auch durch eine bioinformatische Analyse des HCMV Genoms unterstützt, die nur ein sehr geringes Kodierungspotential der putativen ORFs UL106-UL110 im IE4-Bereich ergab (Murphy *et al.*, 2003a) und somit die Expression von größeren Proteinen im IE4-Bereich als unwahrscheinlich erscheinen lässt.

4.2. Analyse der IE4-Genregion mit Hilfe viraler Deletionsmutanten

Trotz intensiver Suche konnte weder im Rahmen dieser Arbeit noch von anderen ein Protein (> 10 kDa) identifiziert werden, dass im IE4-Bereich des HCMV kodiert wird. Die Analyse der Struktur der im IE4-Bereich kodierten RNAs konnte nur in beschränktem Maße zur Aufklärung der Funktion dieser Genomregion beitragen. Aus diesem Grunde wurden gezielt virale Mutanten hergestellt und einer phänotypischen Analyse unterzogen.

Einige der in dieser Arbeit verwendeten Virusmutanten wurden bereits in Vorarbeiten in unserer Arbeitsgruppe hergestellt und charakterisiert („konventionelle Mutanten“). Die Herstellung dieser Mutanten erfolgte durch homologe Rekombination in eukaryonten Zellen. Dieses Vorgehen ist mit einer Reihe von experimentellen Schwächen behaftet,

war aber zu dieser Zeit die einzige Möglichkeit zur gezielten, genetischen Manipulation des 235 kb DNA Genoms von HCMV. Ein wesentlicher Nachteil der Methodik ist, neben einem hohen zeitlichen Aufwand und dem Risiko sekundärer Mutationen, das Fehlen einer einfachen Strategie zur Herstellung von Revertanten. Die Klonierung des HCMV Genoms in BACs erbrachte einen methodischen Durchbruch, der es nunmehr gestattet, die virale DNA in *E. coli* gezielt zu mutagenisieren und die resultierenden Virusmutanten anschließend in eukaryonten Zellen zu rekonstituieren. Ziel der Arbeiten in diesem Abschnitt war es, die mit den konventionellen Mutanten bereits vorliegenden Erkenntnisse zu bestätigen und anhand von gezielten Mutanten und Revertanten, die mit Hilfe der BAC-Technologie generiert werden sollten („BAC-Mutanten“) zu vertiefen (Borst *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2003).

4.2.1. Replikationsverhalten der IE4-Deletionsmutanten

Die konventionellen Mutanten RVAdIL10 und RVAdIE4-2 #129 zeigten eine Einschränkung in ihrer Replikationsfähigkeit, während das Virus RVAdIE4-1 #7 vergleichbar zum Wildtyp Ad169 replizierte. Der in RVAdIE4-2 #129 deletierte Genombereich beinhaltet den putativen ORF UL108. Eine in der Literatur beschriebene Δ UL108-Mutante war in analoger Weise in ihrer Vermehrungsfähigkeit beeinträchtigt (Dunn *et al.*, 2003). Unerwartet war aber, dass die Mutante RVAdIE4-1 #7 kein Replikationsdefizit aufwies, obwohl der in RVAdIE4-2 #129 deletierte genomische Abschnitt in RVAdIE4-1 #7 ebenfalls entfernt worden war. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz ist, dass bei der Herstellung von RVAdIE4-2 #129 andere Genombereiche verändert wurden, was die phänotypische Veränderung verursachte. Da sich beide Viren im Ausmaß der IE4-Deletion unterscheiden, ist jedoch nicht auszuschließen, dass diese Unterschiede auf eine bislang nicht näher definierte Weise auf die Replikationskompetenz dieser Viren Einfluss nehmen.

Die Untersuchung von RVAdIL10 zeigte im Gegensatz zu früheren Analysen (Pepperl-Klindworth *et al.*, 2006) eine Einschränkung der Replikationsfähigkeit dieser Mutante. Diese Diskrepanz lässt sich durch die Anwendung verschiedener Methoden zur Bestimmung der Replikationsfähigkeit erklären. Während in früheren Arbeiten die Replikation der Viren mit Hilfe der Bestimmung der sog. TCID₅₀ (*Tissue Culture Infectious dosis* 50) analysiert wurde (Flint *et al.*, 2004), wurden in dieser Arbeit entweder die absolute Zahl der Infektionsereignisse, repräsentiert durch die Anzahl IE⁺-Kerne in einer infizierten Fibroblastenkultur oder die Messung freigesetzter viraler Genome mittels TaqMan-PCR zur Analyse herangezogen. Da diese Methoden die Bestimmung der zu

messenden Größen mit einer hohen Auflösung und Genauigkeit erlauben, erzielen sie eine bessere Vergleichbarkeit des Replikationsverhaltens der untersuchten Viren, als die Bestimmung der TCID₅₀.

Die eingeschränkte Replikationsfähigkeit von RVAdIL10 könnte durch ähnliche Phänomene sekundärer Mutationen erklärbar sein, wie sie bereits für RVAdIE4-2 #129 angeführt wurden. Alternativ könnte durch die eingeführte Deletion die Expression des benachbarten Gens für UL112/113 beeinträchtigt worden sein (siehe Abb. 3.28). Dieses Gen ist für die virale DNA-Replikation essentiell und stellt daneben zusammen mit anderen Faktoren die effiziente Expression der Gene IE1 und IE2 des HCMV sicher (Tang & Maul, 2006). Eine verminderte Expression des UL112/113 Gens würde demzufolge die Expression der essentiellen Transaktivatoren IE1 und IE2 zu sehr frühen Zeitpunkten der Infektion beeinflussen. In Übereinstimmung mit dieser Annahme fanden wir ein deutlich erhöhtes Genom/Infektionsverhältnis von RVAdIL10 im Vergleich zum parentalen Stamm Ad169. Dies bedeutet, dass eine höhere Anzahl an Virionen in die Zelle eingeschleust werden muss, um die IE-Expression zu initiieren. Im Umkehrschluss heißt dies aber, dass, bezogen auf das Einzelgenom, die initiale Expression der Gene IE1 und IE2 nach RVAdIL10 Infektion, im Vergleich zum Ausgangsvirus beeinträchtigt war. Dies ließe sich durch eine Beeinträchtigung der UL112/113 Genexpression erklären.

Im Gegensatz zu den konventionellen Mutanten zeigten alle BAC-Mutanten des IE4-Bereichs und auch die Mutante RV-KK-5, in der Teile des UL111a (cmvIL10) Genbereichs deletiert wurden, im Vergleich zum Wildtypvirus keine Beeinträchtigung des Wachstums. Dieses Ergebnis war erstaunlich, da in einigen der konventionellen und der BAC-Mutanten identische Genombereiche deletiert worden waren (z. Bsp. RVAdIE4-2 #129 und RV-KK-1). Bei den Mutanten RV-KK-1, RV-KK-4 und RV-4 FLP war u. a. der Leserahmen UL108 deletiert: dennoch konnte mit diesen Mutanten der in der Literatur bereits beschriebene Wachstumsdefizit der Δ UL108-Mutante (Dunn *et al.*, 2003) nicht reproduziert werden. Zusammenfassend deutet die Analyse der IE4-BAC-Mutanten darauf hin, dass diese genomische Region für die virale Replikation nicht essentiell ist und keinen Einfluss auf die Vermehrungsfähigkeit in Fibroblastenkulturen hat. Diese Ergebnisse bestätigen die Resultate anderer Autoren (Pepperl, 2000; Pepperl-Klindworth *et al.*, 2006; Kulesza & Shenk, 2006), stehen aber auch im Widerspruch zu Dunn und Kollegen (2003) und den eigenen Analysen der konventionellen Virusmutanten. Da Dunn und Kollegen ebenfalls auf der Grundlage eines BAC-Klons von HCMV die punktgenaue Deletion des Leserahmens UL108 vorgenommen hatten, erscheint hier eine sekundäre Mutation im Genom des HCMV, die

diesen Phänotyp begründet hätte als eher unwahrscheinlich. Beim Vergleich der verschiedenen Mutanten ist jedoch auffällig, dass jeweils unterschiedliche Ausgangsstämme für die Mutagenese eingesetzt wurden und die Abkömmlinge eines bestimmten Stammes jeweils entweder phänotypisch auffällig waren oder keinen veränderten Phänotyp zeigten. Somit drängt sich die Hypothese auf, dass bestimmte stammspezifische Eigenschaften determinieren, ob die Deletion der IE4-Region für die Vermehrungsfähigkeit in Zellkultur relevant wird oder nicht. Eine genaue Untersuchung dieses Phänomens hätte die vollständige genotypische Analyse der 230 kb Genome der jeweiligen Ausgangsviren zur Voraussetzung gehabt. Dieser Aufwand schien ohne weitere Untersuchungen zur Biologie der Mutanten zunächst nicht gerechtfertigt.

4.2.2. Untersuchung der Aktivität der UL97- und UL112/113-Promotoren mit Hilfe des Luciferase-Reportergens

Die lytische DNA-Replikation des HCMV ist in essentieller Weise von der Aktivierung früher viraler Gene abhängig. Diese Genaktivierung stellt nach gegenwärtiger Auffassung einen wichtigen Kontrollpunkt im Lebenszyklus des Virus dar. Es wird angenommen, dass die breite Aktivierung früher Promotoren in den permissiven Zyklus führt, wohingegen bei unzureichender früher Promotoraktivität Latenz etabliert wird. Es lag daher nahe zu vermuten, dass diejenigen IE4-Mutanten, die eingeschränkt replikationsfähig waren auch Einschränkungen in ihrer Fähigkeit zur Aktivierung früher Promotoren aufwiesen. In der Tat konnte diese Vermutung anhand der Zelllinien U373-UL97 und U373-UL112/113 und mit den Viren RVAdIE4-1 #7 und RVAdIE4-2 #129 bestätigt werden (Abb. 3.13). In Übereinstimmung mit ihrem Wachstumsverhalten in Zellkultur waren die frühen Promotoren in der Tat nach Infektion mit der Mutante RVAdIE4-2 #129 deutlich schwächer aktivierbar als nach der Infektion mit RVAdIE4-1 #7. Die verringerte Aktivierbarkeit von UL112/113 hätte Auswirkungen auf die Replikationsfähigkeit des HCMV, da dieses Gen an der Ausbildung von Replikationsdomänen beteiligt ist (Ahn *et al.*, 1999) und synergetisch mit dem Transaktivator IE2 andere frühe Gene aktiviert (Kerry *et al.*, 1996). Das Ausmaß der Beeinträchtigung des UL112/113-Promotors könnte mit der Ausbildung des Replikationsdefizits korrelieren. Im Falle der RVAdIE4-1 #7 Mutante war der Effekt auf das UL112/113 Gen geringer. Dies würde erklären, dass kein Replikationsdefizit beobachtet werden konnte. Die Mutante RVAdIE4-2 #129 wies hingegen eine stärkere Beeinträchtigung des UL112/113 Promotorkonstrukts auf und zeigte somit ein messbares Replikationsdefizit.

Da die Mutante RVAdIL10 frühe Promotoren uneingeschränkt aktivierte, liegt nahe, dass der biologisch aktive Teil des IE4-Bereichs im IE4-Intron lokalisiert ist und nicht im Bereich des Exon 1 der gespleißten 1,1 kb mRNA. Durch die Deletion des Bereichs von Exon 1, wurde damit auch ein Effekt des vIL10-Gens UL111a ausgeschlossen. Die Ergebnisse der Analyse mit einer vergleichbaren Virusmutante (RVTBdIE4 #29) auf der Basis des Wildtypvirus TB40_E ergaben ebenfalls eine deutliche Reduktion der Luciferase-Aktivität in U373-UL112/113 Zellen (Abb. 3.14). Damit konnte demonstriert werden, dass die beobachteten Effekte nicht auf Mutanten mit einer Ad169-Basis beschränkt waren.

Im Gegensatz zu den konventionellen Mutanten führte die Infektion der Promotorzelllinien mit den BAC-Mutanten der IE4-Region zu keiner signifikanten Einschränkung der Aktivität früher viraler Promotoren. Ein direkter Vergleich der beiden Ausgangsviren Ad169 und RV-HB5 zeigte, dass Zellen, die mit RV-HB5 infiziert worden waren, das Luciferase-Gen unter der Kontrolle der frühen Promotoren ~8x stärker exprimierten als Zellen, die mit einer vergleichbaren MOI von Ad169 infiziert worden waren (Abb. 3.39). Diese Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass der IE4-Genbereich in direkter oder indirekter Weise auf die Aktivierung der frühen Genexpression Einfluss nimmt, dass dies aber nur dann sichtbar wird, wie im Falle von Ad169 und davon abgeleiteten Mutanten, wenn andere relevante Faktoren wie IE1 und IE2 limitierend sind.

4.2.3. Analyse der Expression ausgewählter früher Gene durch quantitative *Real-Time* RT-PCR

Die Ergebnisse der Luciferase-Tests deuteten darauf hin, dass die Aktivität früher Gene in den Mutanten RVAdIE4-1 #7 und RVAdIE4-2 #129 beeinträchtigt sein könnte. Diese Erkenntnisse waren jedoch nur indirekt und unter Verwendung von zwei ausgewählten Reporter-Gen-Konstrukten erhalten worden. Um die IE- und E-Genexpression vom viralen Genom in infizierten Fibroblasten beleuchten zu können, wurde die Methodik der quantitativen *Real-Time* RT-PCR (qRT-PCR) eingesetzt. Auf diese Weise konnte die Expression der Gene IE1 und IE2 sowie mehrerer früher HCMV-Gene parallel untersucht und ihre Expression zwischen den Mutanten und den verwendeten Wildtypviren verglichen werden.

Die *Real-Time* PCR stellt eine genaue und empfindliche Methode dar, Nukleinsäuren zu quantifizieren. Absolute Quantifizierungen von Genomen werden erfolgreich zur HCMV-

Diagnostik eingesetzt (Chen *et al.*, 2004) und absolute Quantifizierungen mit Hilfe von *Real-Time* RT-PCR wurden bereits zur Untersuchung der Genexpression in infizierten Zellen verwendet (Hännfler *et al.*, 2002). Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass für jedes zu untersuchende Gen eine eigene Standardreihe mitgeführt werden muss. Dadurch ist die Zahl der Gene die parallel in einem Ansatz untersucht werden können, stark eingeschränkt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein System zur relativen Quantifizierung der Expression der zu analysierenden Gene etabliert. Der Vorteil der relativen Quantifizierung besteht in erster Linie darin, dass auf die Verwendung von Standardkurven verzichtet werden kann (Livak & Schmittgen, 2001). Daher erlaubte dieses System die Expression der Gene IE1, IE2, UL97, UL54, UL44, US11 und des zellulären Referenzgens Cyclophilin für zwei Mutanten und einen Referenzvirus (Wildtyp) in einem Ansatz zu vergleichen. Die Effizienz der PCR-Reaktionen zur Untersuchung der Gene UL112/113 und UL4 erfüllten nicht die Kriterien für die $\Delta\Delta C_T$ -Methode. Daher wurde in einem zweiten Ansatz unter gleichen Reaktionsbedingungen zur relativen Quantifizierung dieser Gene eine modifizierte Methode zur Auswertung verwendet.

Die Untersuchung der Mutante RVAdIE4-1 #7 ergaben keine signifikanten Veränderungen der Transkriptmengen im Vergleich zum Wildtyp. Die im Luciferase-Test geringfügig verringerte Aktivität der UL97- und UL112/113-Promotoren konnte in diesem System nicht bestätigt werden. Dieses Ergebnis stimmte mit den Replikationskinetiken überein, die für RVAdIE4-1 #7 kein Replikationsdefizit ergaben. Es ist davon auszugehen, dass aufgrund der höheren Sensitivität im Reporter-Test geringgradigere Unterschiede erfasst wurden, die keinen signifikanten Einfluss auf die Replikationsfähigkeit der Mutante RVAdIE4-1 #7 hatten. Für die Mutante RVAdIE4-2 #129 konnte die eingeschränkte Aktivierung der Promotoren der UL97- und UL112/113-Gene mit der qRT-PCR reproduziert werden. Allerdings fielen die Reduktionen der Transkriptmengen etwas geringer aus als die entsprechende Reduktion der Luciferase-Aktivität. Die Reduktion der Promotoraktivität sämtlicher untersuchter früher Gene deutet ebenfalls darauf hin, dass der beobachtete Replikationsdefizit tatsächlich auf eine beeinträchtigte frühe Genexpression zurückzuführen ist.

Die Mutante RVAdIL10 zeigte keine reproduzierbaren Veränderungen der Promotoraktivität der untersuchten Gene. Das mit dieser Mutante beobachtete Replikationsdefizit, ist daher vermutlich auf Veränderungen in anderen Genen zurück zu führen. Die Messung der Transkriptionsaktivität bestätigt allerdings die Ergebnisse der Luciferase-Tests, in denen keine Beeinträchtigung der UL97- und UL112/113-Genexpression beobachtet werden konnte. Somit konnte die oben geäußerte

Vermutung, dass bei der Herstellung der Mutante der UL112/113 Promotor in Mitleidenschaft gezogen wurde, mit der qRT-PCR nicht bestätigt werden.

Durch die Analyse der Genexpression der BAC-Mutanten mittels qRT-PCR konnten die Ergebnisse der Luciferase-Tests im Wesentlichen bestätigt werden. In der Tat konnten insgesamt keine Abweichungen in der Genexpression der untersuchten Viren beobachtet werden, die hinreichend verlässlich reproduzierbar und signifikant gewesen wären. Nur in Einzelfällen konnten Veränderungen in der Transkription ausgewählter Gene nach Infektion mit bestimmten Mutanten detektiert werden. So wurde beispielsweise nach Infektion mit RV-KK-1 in reproduzierbarer Weise verstärkt IE2-RNA nachgewiesen, während die selbe RNA nach Infektion mit RV-3 FLP vermindert gefunden wurde. Die Signifikanz dieser geringgradigen Unterschiede muss jedoch in Zweifel gezogen werden. Dies gilt insbesondere, da die Expression von Transkripten des UL112/113 Gens, welches streng IE2-abhängig ist, nach Infektion mit beiden Viren nicht signifikant vom Normalmaß abwich. Die Mutante RV-4 FLP II, die im Luciferase-Test eine verringerte UL112/113 Expression zeigte, wies in der qRT-PCR keine messbaren Veränderungen der UL112/113 Expression auf (Abb. 3.45). Die praktisch in allen BAC-Mutanten messbare Erhöhung der UL97-Transkription, kann nicht eindeutig erklärt werden. Denkbar sind Unterschiede in den Effizienzen der PCR-Reaktionen, die einen großen Einfluss auf die Quantifizierung haben können (Livak & Schmittgen, 2001; Scheffe *et al.*, 2006).

Diese offensichtlichen Schwankungen bei der Analyse mittels qRT-PCR machen deutlich, dass geringgradige Unterschiede in der Menge an Transkripten in der infizierten Zelle mit diesem Ansatz nicht auflösbar sind. Bei der Interpretation der Ergebnisse muss weiterhin bedacht werden, dass die in dieser Arbeit verwendeten Systeme zur Messung der Promotoraktivität sich bereits im verwendeten Zellsystem unterscheiden, da die Luciferase-Messungen in MGU373-Zellen durchgeführt wurden, die *Real-Time* RT-PCR Analysen an RNA Präparationen aus infizierten HFF. Es ist unklar welche Unterschiede der viralen Gen-Expression in diesen Zellsystemen auftreten. Der Vergleich der Transkriptquantifizierung und der Luciferase-Tests für die Mutante RVAdIE4-2 #129 ergab, dass Veränderungen der Luciferase-Aktivität sich nicht unbedingt in gleicher Stärke in Veränderungen der Transkriptionsaktivität des untersuchten Promotors niederschlagen. Diese Tatsache könnte im Fall der Mutante RVAdIE4-1 #7 erklären, warum die im Luciferase-Test gemessene verringerte Aktivität der Promotorkonstrukte sich nicht in einer messbaren Veränderung der Transkriptionsaktivität zeigte. Unter Berücksichtigung dieser Aspekte, kann zusammenfassend aber festgestellt werden,

dass die qRT-PCR Analyse die Ergebnisse des Reporter-Gen-Tests prinzipiell bestätigen konnte.

4.2.4. Vergleich der IE1/IE2 Expression in RV-HB5 und Ad169

Die Ergebnisse der Luciferase-Tests deuteten auf Unterschiede in der IE-Genexpression oder dem Prozess der E-Genaktivierung zwischen den beiden verwendeten viralen Ausgangsstämmen hin (Abb. 3.39). Wie oben ausgeführt, könnten stammspezifische Unterschiede in der Expression der IE-Gene, bezogen auf Einzelgenome, das Fehlen eines Phänotyps in den BAC-Mutanten erklären.

Ein Vergleich der Stämme Ad169 und RV-HB5 ergab, dass sowohl auf RNA- wie auf Proteinebene die Gene IE1 und IE2 nach Infektion mit RV-HB5 effizienter exprimiert werden. Unter der Annahme, dass IE4 eine unterstützende Wirkung auf die IE1/IE2-vermittelte Aktivierung der frühen Promotoren UL97 und UL112/113 ausübt, wäre denkbar, dass dieser Effekt nur dann sichtbar wird, wenn die IE1/IE2-Expression in der infizierten Zelle limitierend ist. So könnte bei Mutanten auf der Basis von Ad169 die Deletion des IE4-Bereichs in der Tat zu einer Verminderung der Aktivität früher Promotoren führen, die in der Folge eine Einschränkung der Replikationsfähigkeit dieser Viren begründet. Demgegenüber könnte in Zellen, die mit pHB5-Mutanten infiziert werden, per se durch die höhere IE1/IE2 Expression eine maximale E-Promotor Aktivierung vermittelt werden, die durch eine Deletion des IE4-Bereichs nicht messbar verändert wird.

Diese Unterschiede der Genexpression der Wildtypviren sind generell von Bedeutung, da sie die Ergebnisse von Expressions- oder Funktionsstudien anderer Gene beeinflussen. Die Tatsache, dass die Deletion des IE4-Bereichs in RV-HB5 zu keinem messbaren Phänotyp führte, eröffnet jedoch auch die Möglichkeit, den IE4-Bereich zu verwenden, um Gene heterolog im Kontext des Virusgenoms zu exprimieren. Da das HCMV Genome, die größer als das Wildtypgenom sind, weniger effizient in Viruspartikel verpackt, kann der IE4-Bereich gegen das zu exprimierende Gen ausgetauscht werden, ohne damit essentielle Gene zu deletieren oder die Verpackungseffizienz zu beeinträchtigen.

4.3. Mögliche Funktionsmechanismen des IE4-Introns

Die Erkenntnisse aus dieser Arbeit und die vorliegenden Publikationen zu diesem Thema legen nahe, dass es sich bei dem als 5 kb RNA bezeichneten Transkript des HCMV in der Tat um ein stabiles Intron handelt (Plachter *et al.*, 1988; Rawlinson & Barrell, 1993; Kulesza & Shenk, 2004). Obwohl einige der im IE4-Bereich liegenden putativen ORFs auch in klinischen Isolaten konserviert sind (Murphy *et al.*, 2003b), konnte trotz intensiver Suche mittels Sequenzanalyse, cDNA-Klonierung und transienter Transfektion kein Hinweis darauf erhalten werden, dass von dieser RNA oder der 1,1 kb RNA ein funktionelles Protein kodiert wird. Gleichwohl zeigen virale IE4-Deletionsmutanten sowohl *in vitro* ((Dunn *et al.*, 2003); diese Arbeit) als auch, im Falle von MCMV, *in vivo* phänotypische Veränderungen, die auf eine funktionelle Bedeutung der 5 kb RNA für die Virusvermehrung und Virusverbreitung hindeuten. Die molekularen Mechanismen, die dem zugrunde liegen, sind jedoch vollkommen unverstanden und konnten im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht näher beleuchtet werden.

Die Beeinträchtigung der frühen Genexpression und das Replikationsdefizit der konventionellen IE4-Deletionsmutanten in Fibroblasten könnte eine mögliche Erklärung für das Replikationsdefizit in den Speicheldrüsen der Maus liefern. Dies würde bedeuten, dass der IE4-Bereich nur in speziellen Zelltypen oder Organen relevant ist. Da das HCMV nur in wenigen Zelltypen in Kultur vermehrt werden kann, gleichzeitig aber aufgrund seiner Wirtsspezifität Analysen *in vivo* nicht durchführbar sind, werden sich weitere Analysen der Zelltyp-Spezifität auf die Untersuchung des IE4-Orthologs in MCMV konzentrieren müssen.

Obwohl keine funktionellen Erkenntnisse über die Rolle des 5 kb Introns von HCMV bekannt sind, lässt der Vergleich mit ähnlichen Phänomenen Raum für Spekulation. So gibt es deutliche Analogien zu HSV-1, das während der latenten Phase der Infektion so genannte „Latency Associated Transcripts“ oder LATs exprimiert. Auch hierbei handelt es sich um stabile Introns (Wu *et al.*, 1998), die ausschließlich während der Latenz bzw. Reaktivierung gebildet werden (Spivack & Fraser, 1988). Eines dieser Introns weist anti-apoptotische Eigenschaften in infizierten Zellen auf (Perng *et al.*, 2000). Es wurde gezeigt, dass dieser Effekt durch eine im LAT kodierte miRNA hervorgerufen wird. Diese miRNA beeinträchtigt die Stabilität von zellulären RNAs die für pro-apoptotische Faktoren kodieren. Sie soll so die Etablierung und den Erhalt der Latenz in infizierten Zellen fördern (Gupta *et al.*, 2006). Zwar konnte in einigen Vorversuchen keine Verstärkung der Apoptose in HFF nach der Infektion mit IE4-Deletionsmutanten

beobachtet werden (Abb. 3.20): jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die IE4-RNA in anderen Zellen und unter anderen Bedingungen, z. B. bei der Etablierung der Latenz wie bei HSV-1, einen Einfluss auf die Induktion des programmierten Zelltods hat. Eine genauere Analyse dieses Phänomens muss weiterführenden Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Bisher konnten mit Hilfe bioinformatischer Ansätze mehrere miRNA-Kandidaten im HCMV-Genom identifiziert werden. Einige dieser Moleküle konnten in Northern Blot Analysen auch verifiziert werden. Keiner dieser miRNA-Kandidaten war jedoch im IE4-Intron lokalisiert (Dunn *et al.*, 2005; Grey *et al.*, 2005; Pfeffer *et al.*, 2005). In einer kürzlich erschienen Publikation konnten allerdings im IE4-Ortholog des MCMV, der 7,2 kb RNA, mehrere miRNAs nachgewiesen und kloniert werden (Buck *et al.*, 2007). Es bleibt abzuwarten, ob diesen miRNAs Funktionen, bzw. Zielgene zugeordnet werden können.

In Drosophila- und Säugerzellen werden ncRNAs mit Größen um die 10.000 Nukleotide kodiert, die im Zusammenhang mit der Dosiskompensation die Regulation bestimmter Gene, ganzer Chromosomenabschnitte oder die Inaktivierung des zweiten X-Chromosoms vermitteln. Diese ncRNAs bedecken den genomischen Abschnitt, welcher die zu regulierenden Gene enthält und rekrutieren Proteinkomplexe, die dann die regulativen Funktionen vermitteln. So können diese z. B. durch die Rekrutierung von Transkriptionfaktoren die Transkription erhöhen oder durch die Ausbildung von geschlossenen Chromatinstrukturen die Expression in dieser Region unterdrücken (Storz, 2002; Andersen & Panning, 2003). Es wäre denkbar, dass die 5 kb RNA in der infizierten Zelle ähnliche Funktionen hat. Es ist jedoch noch unklar, ob die RNA im Zellkern beispielsweise bevorzugt in räumlicher Assoziation mit viralen Genomen vorliegt und damit unmittelbar Einfluss auf die virale Genexpression nehmen kann. Alternativ wäre in ähnlicher Weise ein Einfluss auf die zelluläre Genexpression denkbar.

Die biologische Funktion einer weiteren ncRNA in HCMV konnte kürzlich aufgeklärt werden. Die als „ β -2.7 kb Transkript“ bekannte RNA kodiert nicht für ein Protein, wird aber abundant mit früher Kinetik in der permissiv infizierten Zelle exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Transkript anti-apoptische Wirkung besitzt. Diese Wirkung konnte auf eine direkte Interaktion der RNA mit dem Faktor GRIM-19 zurückgeführt werden. Das β -2.7 kb Transkript beeinflusst die Lokalisation des GRIM-19 Proteins (*Genes Associated with retinoid/interferon-induced mortality-19*) einer Untereinheit des Komplex I der Atmungskette in der mitochondrialen Membran. Die Interaktion mit GRIM-19 führte in infizierten Zellen zu einer Reduktion des mitochondrial induzierten Zelltods und zur Aufrechterhaltung der ATP-Produktion. Diese Prozesse unterstützen die

lytische Virusvermehrung (Reeves *et al.*, 2007). Es ist unklar, ob die 5 kb RNA mit Proteinen der infizierten Zelle interagieren kann und so einen biologischen Effekt vermittelt. Die Erkenntnisse aus dieser Arbeit stellen die Grundlage dar, diese Frage systematisch näher zu untersuchen. Postuliert man einen vergleichbaren Mechanismus für das IE4-Transkript, dann sollte es z. B. mit Hilfe von North-Western Blots oder Co-Immunpräzipitationen möglich sein eine solche Interaktion zu zeigen. In der Folge wäre es möglich durch Proteinsequenzierung diesen unbekanntem Interaktionspartner zu identifizieren und der Funktion der IE4-Region für die Vermehrung des HCMV näher zu kommen.

5. Literaturverzeichnis

- Ahn, J. H., Jang, W. J. & Hayward, G. S. (1999).**The Human Cytomegalovirus IE2 and UL112-113 Proteins Accumulate in Viral DNA Replication Compartments That Initiate from the Periphery of Promyelocytic Leukemia Protein-Associated Nuclear Bodies (PODs or ND10). *J Virol* **73**, 10458-10471.
- Ahn, K., Angulo, A., Ghazal, P., Peterson, P. A., Yang, Y. & Fruh, K. (1996).**Human cytomegalovirus inhibits antigen presentation by a sequential multistep process. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**, 10990-10995.
- Alberola, J., Tamarit, A., Igual, R. & Navarro, D. (2000).**Early neutralizing and glycoprotein B (gB)-specific antibody responses to human cytomegalovirus (HCMV) in immunocompetent individuals with distinct clinical presentations of primary HCMV infection. *J Clin Virol* **16**, 113-122.
- Anders, D. G. & McCue, L. A. (1996).**The human cytomegalovirus genes and proteins required for DNA synthesis. *Intervirology* **39**, 378-88.
- Andersen, A. A. & Panning, B. (2003).**Epigenetic gene regulation by noncoding RNAs. *Current Opinion in Cell Biology* **15**, 281-289.
- Andreoni, M., Faircloth, M., Vugler, L. & Britt, W. J. (1989).**A rapid microneutralization assay for the measurement of neutralizing antibody reactive with human cytomegalovirus. *Journal of Virological Methods* **23**, 157-167.
- Arlt, H., Lang, D., Gebert, S. & Stamminger, T. (1994).**Identification of binding sites for the 86-kilodalton IE2 protein of human cytomegalovirus within an IE2-responsive viral early promoter. *J Virol* **68**, 4117-4125.
- Bain, M., Reeves, M. B. & Sinclair, J. (2006).**Regulation of Human Cytomegalovirus Gene Expression by Chromatin Remodelling. In *Cytomegaloviruses: Molecular Biology and Immunity*, 1 edn. Edited by Reddehase, M. J. & Lemmermann, N.
- Bertani, G. (1951).**STUDIES ON LYSOGENESIS I.: The Mode of Phage Liberation by Lysogenic Escherichia coli. *J Bacteriol* **62**, 293-300.
- Boehme, K. W. & Compton, T. (2006).**Virus Entry and Activation of Innate Immunity. In *Cytomegaloviruses: Molecular Biology and Immunity*, 1 edn. Edited by Reddehase, M. J. & Lemmermann, N.
- Borst, E. M., HAHN, G., KOSZINOWSKI, U. H. & MESSERLE, M. (1999).**Cloning of the human cytomegalovirus (HCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome in Escherichia coli: a new approach for construction of HCMV mutants. *J Virol* **73**, 8320-8329.
- Bresnahan, W. A. & Shenk, T. (2000).** A Subset of Viral Transcripts Packaged Within Human Cytomegalovirus Particles. 288 edn, pp. 2373-2376.
- Britt, W. & Boppana, S. (2004).**Human Cytomegalovirus Virion Proteins. *Hum Immunol* **65**, 395-402.
- Buck, A. H., Santoyo-Lopez, avier & other authors (2007).**Discrete clusters of viral encoded miRNAs are associated with complementary strands of the genome and the 7.2- kb stable intron in murine cytomegalovirus. *J Virol Preprint*.
- Bustin, S. A. (2000).**Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* **25**, 169-193.

- Butcher, S. J., Aitken, J., Mitchell, J., Gowen, B. & Dargan, D. J. (1998).**Structure of the Human Cytomegalovirus B Capsid by Electron Cryomicroscopy and Image Reconstruction. *Journal of Structural Biology* **124**, 70-76.
- Calvin, N. M. & Hanawalt, P. C. (1988).**High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J Bacteriol* **170**, 2796-2801.
- Cha, T. A., Tom, E., Kemble, G. W., Duke, G. M., Mocarski, E. S. & Spaete, R. R. (1996).**Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *J Virol* **70**, 78-83.
- Challberg, M. D. & Kelly, T. J. (1989).**Animal Virus DNA Replication. *Annual Review of Biochemistry* **58**, 671-713.
- Chee, M. S., Bankier, A. T., Beck, S. & other authors (1990).**Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol* **154**, 125-169.
- Chen, D. H., Jiang, H., Lee, M., Liu, F. & Zhou, Z. H. (1999).**Three-Dimensional Visualization of Tegument/Capsid Interactions in the Intact Human Cytomegalovirus. *Virology* **260**, 10-16.
- Chen, F. H., Samson, K. T., Chen, H., Pan, S. N., He, Z. X., Iikura, Y. & Shioda, S. (2004).**Clinical applications of real-time PCR for diagnosis and treatment of human cytomegalovirus infection in children. *Pediatric Allergy and Immunology* **15**, 210-215.
- Compton, T., Nowlin, D. M. & Cooper, N. R. (1993).**Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology* **193**, 834-841.
- Craig, J. M., Macauley, J. C., Weller, T. H. & Wirth, P. (1957).**Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illnesses resembling cytomegalic inclusion disease. *Proc Soc Exp Biol Med* **94**, 4-12.
- Cullen, B. R. (2007).**IMMUNOLOGY: Outwitted by Viral RNAs. *Science* **317**, 329-330.
- Davison, A. J. & Stow, N. D. (2005).** New Genes from Old: Redeployment of dUTPase by Herpesviruses. *79*, No.20 edn, pp. 12880-12892.
- Dolan, A., Cunningham, C., Hector, R. D. & other authors (2004).**Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *J Gen Virol* **85**, 1301-1312.
- Doniger, J., Muralidhar, S. & Rosenthal, L. J. (1999).**Human cytomegalovirus and human herpesvirus 6 genes that transform and transactivate. *Clin Microbiol Rev* **12**, 367-382.
- Dunn, W., Chou, C., Li, H., Hai, R., Patterson, D., Stolc, V., Zhu, H. & Liu, F. (2003).**Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 14223-14228.
- Dunn, W., Trang, P., Zhong, Q., Yang, E., van Belle, C. & Liu, F. (2005).**Human cytomegalovirus expresses novel microRNAs during productive viral infection. *Cellular Microbiology* **7**, 1684-1695.
- Eddy, S. R. (2002).**Computational Genomics of Noncoding RNA Genes. *Cell* **109**, 137-140.
- Feire, A. L., Koss, H. & Compton, T. (2004).**Cellular integrins function as entry receptors for human cytomegalovirus via a highly conserved disintegrin-like domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 15470-15475.
- Fleckenstein, B., Muller, I. & Collins, J. (1982).**Cloning of the complete human cytomegalovirus genome in cosmids. *Gene* **18**, 39-46.
- Flint, S. J., Enquist, L. W., Racaniello, V. R. & Skalka, A. M. (2004).***Principles of Virology*.

- Gibson, W. (2006).** Assembly and Maturation of the Capsid. In *Cytomegaloviruses: Molecular Biology and Immunity*, 1 edn. Edited by Reddehase, M. J. & Lemmermann, N.
- Ginzinger, D. G. (2002).** Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology* **30**, 503-512.
- Goldmacher, V. S., Bartle, L. M., Skaletskaya, A. & other authors (1999).** A cytomegalovirus-encoded mitochondria-localized inhibitor of apoptosis structurally unrelated to Bcl-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 12536-12541.
- Grant, S. G. N., Jessee, J., Bloom, F. R. & Hanahan, D. (1990).** Differential Plasmid Rescue From Transgenic Mouse DNAs Into Escherichia coli Methylation-Restriction Mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **87**, 4645-4649.
- Greaves, R. F. & Mocarski, E. S. (1998).** Defective growth correlates with reduced accumulation of a viral DNA replication protein after low-multiplicity infection by a human cytomegalovirus ie1 mutant. *J Virol* **72**, 366-379.
- Grey, F., Antoniewicz, A., Allen, E., Saugstad, J., McShea, A., Carrington, J. C. & Nelson, J. (2005).** Identification and Characterization of Human Cytomegalovirus-Encoded MicroRNAs. *J Virol* **79**, 12095-12099.
- Gupta, A., Gartner, J. J., Sethupathy, P., Hatzigeorgiou, A. G. & Fraser, N. W. (2006).** Anti-apoptotic function of a microRNA encoded by the HSV-1 latency-associated transcript. *Nature* **442**, 82-85.
- Hakki, M., Riddell, S. R., Storek, J., Carter, R. A., Stevens-Ayers, T., Sudour, P., White, K., Corey, L. & Boeckh, M. (2003).** Immune reconstitution to cytomegalovirus after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: impact of host factors, drug therapy, and subclinical reactivation. *Blood* **102**, 3060-3067.
- Hännfler, J., Kreuzer, K. A., Laurisch, K., Tomic, S., Oettle, H. & Schmidt, C. (2002).** Quantitation of the spliced late gene of human cytomegalovirus and its kinetics during experimental infection. *Medical Microbiology and Immunology* **190**, 161-165.
- Harel, N. Y. & Alwine, J. C. (1998).** Phosphorylation of the Human Cytomegalovirus 86-Kilodalton Immediate-Early Protein IE2. *J Virol* **72**, 5481-5492.
- Hebart, H. & Einsele, H. (2004).** Clinical aspects of cmv infection after stem cell transplantation. *Human Immunology* **65**, 432-436.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S. & Griffith, R. (1992).** Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA Sequences. *Nat Biotech* **10**, 413-417.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. & Watson, R. (1993).** Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Nat Biotech* **11**, 1026-1030.
- Hiller, C. (1996).** Einfluß des Tegumentproteins pp65 von humanem Cytomegalovirus auf die initialen Ereignisse nach Infektion. Institut für Klinische und Molekulare Virologie der Universität Erlangen-Nürnberg.
- Hodson, E. M., Jones, C. A., Webster, A. C., Strippoli, G. F., Barclay, P. G., Kable, K., Vimalachandra, D. & Craig, J. C. (2005).** Antiviral medications to prevent cytomegalovirus disease and early death in recipients of solid-organ transplants: a systematic review of randomised controlled trials. *The Lancet* **365**, 2105-2115.
- Hofmann, H., Floss, S. & Stamminger, T. (2000).** Covalent Modification of the Transactivator Protein IE2-p86 of Human Cytomegalovirus by Conjugation to the Ubiquitin-Homologous Proteins SUMO-1 and hSMT3b. *J Virol* **74**, 2510-2524.

- Hofmann, H., Sindre, H. & Stamminger, T. (2002).** Functional Interaction between the pp71 Protein of Human Cytomegalovirus and the PML-Interacting Protein Human Daxx. *J Virol* **76**, 5769-5783.
- Hollenbach, A. D., McPherson, C. J., Mientjes, E. J., Iyengar, R. & Grosveld, G. (2002).** Daxx and histone deacetylase II associate with chromatin through an interaction with core histones and the chromatin-associated protein Dek. *J Cell Sci* **115**, 3319-3330.
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S. & Zumla, A. (2005).** Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* **6**, 279-284.
- Ishov, A. M., Stenberg, R. M. & Maul, G. G. (1997).** Human Cytomegalovirus Immediate Early Interaction with Host Nuclear Structures: Definition of an Immediate Transcript Environment. *J Cell Biol* **138**, 5-16.
- Ishov, A. M., Vladimirova, O. V. & Maul, G. G. (2002).** Daxx-Mediated Accumulation of Human Cytomegalovirus Tegument Protein pp71 at ND10 Facilitates Initiation of Viral Infection at These Nuclear Domains. *J Virol* **76**, 7705-7712.
- Jahn, G., Knust, E., Schmolla, H., Sarre, T., Nelson, J. A., McDougall, J. K. & Fleckenstein, B. (1984).** Predominant immediate-early transcripts of human cytomegalovirus AD 169. *J Virol* **49**, 363-370.
- Jahn, G. & Mach, M. (1990).** Human cytomegalovirus phosphoproteins and glycoproteins and their coding regions. *Curr Top Microbiol Immunol* **154**, 171-185.
- Jenkins, P. J., Binne, U. K. & Farrell, P. J. (2000).** Histone Acetylation and Reactivation of Epstein-Barr Virus from Latency. *J Virol* **74**, 710-720.
- Keller, M. J., Wu, A. W., Andrews, J. I., McGonagill, P. W., Tibesar, E. E. & Meier, J. L. (2007).** Reversal of Human Cytomegalovirus Major Immediate-Early Enhancer/Promoter Silencing in Quiescently Infected Cells via the Cyclic AMP Signaling Pathway. *J Virol* **81**, 6669-6681.
- Kerry, J. A., Priddy, M. A., Jervey, T. Y. & other authors (1996).** Multiple regulatory events influence human cytomegalovirus DNA polymerase (UL54) expression during viral infection. *J Virol* **70**, 373-382.
- Kinzler, E. R. & Compton, T. (2005).** Characterization of Human Cytomegalovirus Glycoprotein-Induced Cell-Cell Fusion. *J Virol* **79**, 7827-7837.
- Korfhage, C., Fisch, E. & Schröder-Sturmberger, I. (2000).** Solving difficult template problems in RT-PCR. *Qiagen News* **1**, 12.
- Kosinowski, M., Del-Val, M. & Reddehase, M. J. (1990).** Cellular and molecular basis of the protective immune response to cytomegalovirus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* **154**, 189-220.
- Kotenko, S. V., Saccani, S., Izotova, L. S., Mirochnitchenko, O. V. & Pestka, S. (2000).** Human cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog (cmvIL-10). *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 1695-1700.
- Kubat, N. J., Tran, R. K., McAnany, P. & Bloom, D. C. (2004).** Specific Histone Tail Modification and Not DNA Methylation Is a Determinant of Herpes Simplex Virus Type 1 Latent Gene Expression. *J Virol* **78**, 1139-1149.
- Kulesza, C. A. & Shenk, T. (2004).** Human Cytomegalovirus 5-Kilobase Immediate-Early RNA Is a Stable Intron. *J Virol* **78**, 13182-13189.

- Kulesza, C. A. & Shenk, T. (2006).** Murine cytomegalovirus encodes a stable intron that facilitates persistent replication in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 18302-18307.
- Kyhse-Andersen, J. (1984).** Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **10**, 203-209.
- LAEMMLI, U. K. (1970).** Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Landolfo, S., Gariglio, M., Gribaudo, G., Lembo, D. & Pestka, S. (2003).** The human cytomegalovirus. pp. 269-297.
- Lang, D., Gebert, S., Arlt, H. & Stamminger, T. (1995).** Functional interaction between the human cytomegalovirus 86-kilodalton IE2 protein and the cellular transcription factor CREB. *J Virol* **69**, 6030-6037.
- Lang, D. & Stamminger, T. (1993).** The 86-kilodalton IE-2 protein of human cytomegalovirus is a sequence-specific DNA-binding protein that interacts directly with the negative autoregulatory response element located near the cap site of the IE1/2 Enhancer-Promoter. *J Virol* **67**, 323-331.
- Lau, N. C., Lim, L. P., Weinstein, E. G. & Bartel, D. P. (2001).** An Abundant Class of Tiny RNAs with Probable Regulatory Roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **294**, 858-862.
- Lee, E. C., Yu, D., Martinez, d., V, Tessarollo, L., Swing, D. A., Court DL, Jenkins, N. A. & Copeland, N. G. (2001).** A highly efficient *Escherichia coli*-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomics* **73**, 56-65.
- Lee, Y., Kim, M. & Kim, V. M. (2004).** MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* **23**, 4051-4060.
- Livak, K. J., Flood, S. J., Marmaro, J., Giusti, W. & Deetz, K. (1995).** Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* **4**, 357-362.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001).** Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* **25**, 402-408.
- Lorz, K., Hofmann, H., Berndt, A., Tavalai, N., Mueller, R., Schlotzer-Schrehardt, U. & Stamminger, T. (2006).** Deletion of Open Reading Frame UL26 from the Human Cytomegalovirus Genome Results in Reduced Viral Growth, Which Involves Impaired Stability of Viral Particles. *J Virol* **80**, 5423-5434.
- Macias, M. P. & Stinski, M. F. (1993).** An In vitro System for Human Cytomegalovirus Immediate Early 2 Protein (IE2)-Mediated Site-Dependent Repression of Transcription and Direct Binding of IE2 to the Major Immediate Early Promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**, 707-711.
- Marchini, A., Liu, H. & Zhu, H. (2001).** Human Cytomegalovirus with IE-2 (UL122) Deleted Fails To Express Early Lytic Genes. *J Virol* **75**, 1870-1878.
- Mathews, D. H., Sabina, J., Zuker, M. & Turner, D. H. (1999).** Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *Journal of Molecular Biology* **288**, 911-940.
- Maul, G. G., Negorev, D., Bell, P. & Ishov, A. M. (2000).** Review: Properties and Assembly Mechanisms of ND10, PML Bodies, or PODs. *Journal of Structural Biology* **129**, 278-287.

- McGeoch, D. J. & Gatherer, D. (2005).** Integrating Reptilian Herpesviruses into the Family Herpesviridae. *J Virol* **79**, 725-731.
- McGeoch, D. J., Rixon, F. J. & Davison, A. J. (2006).** Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Research* **117**, 90-104.
- Meier, J. L. & Stinski, M. F. (2006).** Major Immediate-Early Enhancer and its Gene products. In *Cytomegaloviruses: Molecular Biology and Immunity*, 1 edn. Edited by Reddehase, M. J. & Lemmermann, N.
- Meister, G. & Tuschl, T. (2004).** Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* **431**, 343-349.
- Mendelson, M., Monard, S., Sissons, P. & Sinclair, J. (1996).** Detection of endogenous human cytomegalovirus in CD34+ bone marrow progenitors. *J Gen Virol* **77**, 3099-3102.
- Mettenleiter, T. C. (2002).** Herpesvirus Assembly and Egress. *76*, No. 4 edn, pp. 1537-1547.
- Mettenleiter, T. C. (2004).** Budding events in herpesvirus morphogenesis. *Virus Research* **106**, 167-180.
- Michaelis, M., Kotchetkov, R., Vogel, J. U., Doerr, H. W. & Cinatl, J. (2004).** Cytomegalovirus infection blocks apoptosis in cancer cells. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* **61**, 1307-1316.
- Mocarski, E. S. J. (2002).** Immunomodulation by cytomegaloviruses: manipulative strategies beyond evasion. *10*, No.7 edn, pp. 332-339.
- Mocarski-ES, J. & Courcelle, C. T. (2001).** Cytomegaloviruses and Their Replication. In *Fields Virology*, 4 edn, pp. 2629-2673. Edited by Knipe, D. M. & Howley, P. M. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Mocarski-ES, J., Shenk, T. & Pass, R. F. (2007).** Cytomegaloviruses. In *Fields Virology*, 5 edn, pp. 2701-2772. Edited by Knipe, D. M. & Howley, P. M. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Möller, A. & Schmitz, M. L. (2003).** Viruses as Hijackers of PML Nuclear Bodies. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* **51**, 295-300.
- Murphy, E., Rigoutsos, I., Shibuya, T. & Shenk, T. E. (2003a).** Reevaluation of human cytomegalovirus coding potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 13585-13590.
- Murphy, E., Yu, D., Grimwood, J. & other authors (2003b).** Coding potential of laboratory and clinical strains of human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 14976-14981.
- Murphy, K. (1998).** Use of Bacteriophage lambda Recombination Functions To Promote Gene Replacement in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **180**, 2063-2071.
- Murphy, J.C., Fischle, W., Verdin, E. & Sinclair, J. (2002).** Control of cytomegalovirus lytic gene expression by histone acetylation. *EMBO J* **21**, 1112-1120.
- Nelson, J. A., Fleckenstein, B., Galloway, D. A. & McDougall, J. K. (1982).** Transformation of NIH 3T3 cells with cloned fragments of human cytomegalovirus strain AD169. *J Virol* **43**, 83-91.
- Nelson, J. A., Fleckenstein, B., Jahn, G., Galloway, D. A. & McDougall, J. K. (1984).** Structure of the transforming region of human cytomegalovirus AD169. *J Virol* **49**, 109-115.
- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F. & Riccardi, C. (1991).** A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Journal of Immunological Methods* **139**, 271-279.

- Nigro, G., Adler, S. P., La Torre, R., Best, A. M. & the Congenital Cytomegalovirus Collaborating Group (2005).** Passive Immunization during Pregnancy for Congenital Cytomegalovirus Infection. *N Engl J Med* **353**, 1350-1362.
- Pellet, E. P. & Roizmann, B. (2007).** The Family: *Herpesviridae* A Brief Introduction. In *Fields: Virology*, 5 edn, pp. 2479-2500. Edited by Knipe, D. M. & Howley, P. M.
- Pepperl, S. (2000).** Untersuchung des immunogenen Potentials von *Dense Bodies* des Humanen Cytomegalovirus (HCMV) als Grundlage für die Entwicklung einer neuartigen HCMV-Vakzine. Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg Universität Mainz.
- Pepperl-Klindworth, S., Besold, K., Frankenberg, N., Farkas, M., Kuball, J., Theobald, M. & Plachter, B. (2006).** Cytomegalovirus interleukin-10 expression in infected cells does not impair MHC class I restricted peptide presentation on bystander antigen-presenting cells. *Viral Immunol* **19**, 92-101.
- Perng, G. C., Jones, C., Ciacci-Zanella, J. & other authors (2000).** Virus-Induced Neuronal Apoptosis Blocked by the Herpes Simplex Virus Latency-Associated Transcript. *Science* **287**, 1500-1503.
- Pfeffer, S., Sewer, A., Lagos-Quintana, M. & other authors (2005).** Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat Meth* **2**, 269-276.
- Pfeffer, S., Zavolan, M., Grasser, F. A. & other authors (2004).** Identification of Virus-Encoded MicroRNAs. *Science* **304**, 734-736.
- Pizzorno, M. C., O'Hare, P., Sha, L., LaFemina, R. L. & Hayward, G. S. (1988).** trans-activation and autoregulation of gene expression by the immediate-early region 2 gene products of human cytomegalovirus. *J Virol* **62**, 1167-1179.
- Plachter, B., Traupe, B., Albrecht, J. & Jahn, G. (1988).** Abundant 5 kb RNA of human cytomegalovirus without a major translational reading frame. *J Gen Virol* **69**, 2251-2266.
- Plachter, B., Britt, W., Vornhagen, R., Stamminger, T. & Jahn, G. (1993).** Analysis of Proteins Encoded by IE Regions 1 and 2 of Human Cytomegalovirus Using Monoclonal Antibodies Generated against Recombinant Antigens. *Virology* **193**, 642-652.
- Plasterk, R. H. A. (2002).** RNA Silencing: The Genome's Immune System. *Science* **296**, 1263-1265.
- Preston, C. M. & Nicholl, M. J. (2006).** Role of the cellular protein hDaxx in human cytomegalovirus immediate-early gene expression. *J Gen Virol* **87**, 1113-1121.
- Prichard, M. N., Spaete, R. R. & Kemble, G. W. (2001).** A review of genetic differences between limited and extensively passaged human cytomegalovirus strains. *Rev Med Virol* **11**, 191-200.
- Rapp, M., MESSERLE, M., Buhler, B., Tannheimer, M., Keil, G. M. & KOSZINOWSKI, U. H. (1992).** Identification of the murine cytomegalovirus glycoprotein B gene and its expression by recombinant vaccinia virus. *J Virol* **66**, 4399-4406.
- Rawlinson, W. D. & Barrell, B. G. (1993).** Spliced transcripts of human cytomegalovirus. *J Virol* **67**, 5502-5513.
- Reddehase, M. J., Weiland, F., Münch, K., Jonjic, S., Luske, A. & KOSZINOWSKI, U. H. (1985).** Interstitial murine cytomegalovirus pneumonia after irradiation: characterization of cells that limit viral replication during established infection of the lungs. *J Virol* **55**, 264-273.
- Reeves, M. B., Davies, A. A., McSharry, B. P., Wilkinson, G. W. & Sinclair, J. H. (2007).** Complex I Binding by a Virally Encoded RNA Regulates Mitochondria-Induced Cell Death. *Science* **316**, 1345-1348.

- Reeves, M. B., Lehner, P. J., Sissons, J. G. P. & Sinclair, J. H. (2005a).**An in vitro model for the regulation of human cytomegalovirus latency and reactivation in dendritic cells by chromatin remodelling. *J Gen Virol* **86**, 2949-2954.
- Reeves, M. B., MacAry, P. A., Lehner, P. J., Sissons, J. G. P. & Sinclair, J. H. (2005b).**Latency, chromatin remodeling, and reactivation of human cytomegalovirus in the dendritic cells of healthy carriers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 4140-4145.
- Ribbert, H. (1904).**Über protozoenartige Zellen in der Niere eines syphilitischen Neugeborenen und in der Parotis von Kindern. *Zentralbl Allg Pathol* **15**, 945-948.
- Robbins, S. H., Rupp, B., Kosinowski, M. & Dalod, M. (2006).**Natural Killer Cells Promote Early CD8 T Cell Responses against Cytomegalovirus. *PLOS Pathogens* **3**, 1152-1164.
- Roizmann, B., Desrosiers, R. C., Fleckenstein, B., Lopez, C., Minson, A. C. & Studdert, M. J. (1992).**The family Herpesviridae: an update. *Archives of Virology* **123**, 425-449.
- Rowe, W. P., Hartley, J. W., Waterman, S., Turner, H. C. & Huebner, R. J. (1956).**Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. *Proc Soc Exp Biol Med* **92**, 418-424.
- Ryckman, B. J., Jarvis, M. A., Drummond, D. D., Nelson, J. A. & Johnson, D. C. (2006).**Human Cytomegalovirus Entry into Epithelial and Endothelial Cells Depends on Genes UL128 to UL150 and Occurs by Endocytosis and Low-pH Fusion. *J Virol* **80**, 710-722.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988).**Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001).***Molecular cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambucetti, L. C., Cherrington, J. M., Wilkinson, G. W. & Mocarski, E. S. (1989).**NF-kappa B activation of the cytomegalovirus enhancer is mediated by a viral transactivator and by T cell stimulation. *EMBO J* **8**, 4251-4258.
- Samols, M. A., Hu, J., Skalsky, R. L. & Renne, R. (2005).**Cloning and Identification of a MicroRNA Cluster within the Latency-Associated Region of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. *J Virol* **79**, 9301-9305.
- Sanchez, V. & Spector, D. H. (2006).**Exploitation of Host Cell Cycle Regulatory Pathways by HCMV. In *Cytomegaloviruses: Molecular Biology and Immunity*, 1 edn. Edited by Reddehase, M. J. & Lemmermann, N.
- Sanchez, V., Sztul, E. & Britt, W. J. (2000).**Human cytomegalovirus pp28 (UL99) localizes to a cytoplasmic compartment which overlaps the endoplasmic reticulum-golgi-intermediate compartment. *J Virol* **74**, 3842-3851.
- Sarnow, P., Jopling, C. L., Norman, K. L., Schmitt, S. & Wehner, K. A. (2006).**MicroRNAs: expression, avoidance and subversion by vertebrate viruses. *Nat Rev Micro* **4**, 651-659.
- Scheffe, J., Lehmann, K., Buschmann, I., Unger, T. & Funke-Kaiser, H. (2006).**Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel 2^{-C_T} gene expression difference formula. *Journal of Molecular Medicine* **84**, 901-910.
- Schendorn, E. T. & Mierendorf, R. C. J. (1985).**A novel transcription property of SP6 and T7 RNA polymerases: dependence on template structure. *Nucl Acids Res* **13**, 6223-6236.
- Schierling, K., Stamminger, T., Mertens, T. & Winkler, M. (2004).**Human Cytomegalovirus Tegument Proteins ppUL82 (pp71) and ppUL35 Interact and Cooperatively Activate the Major Immediate-Early Enhancer. *J Virol* **78**, 9512-9523.

- Schwartz, R., Sommer, M. H., Scully, A. & Spector, D. H. (1994).** Site-specific binding of the human cytomegalovirus IE2 86-kilodalton protein to an early gene promoter. *J Virol* **68**, 5613-5622.
- Seo, J. Y. & Britt, W. J. (2007).** Cytoplasmic Envelopment of Human Cytomegalovirus Requires the Postlocalization Function of Tegument Protein pp28 within the Assembly Compartment. *J Virol* **81**, 6536-6547.
- Shaw, S. B., Rasmussen, R. D., McDonough, S. H., Staprans, S. I., Vacquier, J. P. & Spector, D. H. (1985).** Cell-related sequences in the DNA genome of human cytomegalovirus strain AD169. *J Virol* **55**, 843-848.
- Shizuya, H., Birren, B., Kim, U., Mancino, V., Slepak, T., Tachiiri, Y. & Simon, M. (1992).** Cloning and Stable Maintenance of 300-Kilobase-Pair Fragments of Human DNA in Escherichia coli Using an F-Factor-Based Vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**, 8794-8797.
- Sinclair, J. & Sissons, P. (2006).** Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J Gen Virol* **87**, 1763-1779.
- Sindre, H., Rollag, H. & Hestdal, K. (2000).** Human cytomegalovirus induces apoptosis in the hematopoietic cell line MO7e. *APMIS* **108**, 223-230.
- Singh & Compton, T. (2004).** The IE1 Protein of Human Cytomegalovirus is a Key Component of Host Innate Immunity. In *International Herpesvirus Workshop*, p. Abstract 11.02. Rhino, Nevada, USA.
- Sinzger, C., Grefte, A., Plachter, B., Gouw, A. S. H., The, T. H. & Jahn, G. (1995).** Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in-vivo. *J Gen Virol* **76**, 741-750.
- Sinzger, C., Schmidt, K., Knapp, J., Kahl, M., Beck, R., Waldman, J., Hebart, H., Einsele, H. & Jahn, G. (1999).** Modification of human cytomegalovirus tropism through propagation in vitro is associated with changes in the viral genome. *J Gen Virol* **80**, 2867-2877.
- Skaletskaya, A., Bartle, L. M., Chittenden, T., McCormick, A. L., Mocarski, E. S. & Goldmacher, V. S. (2001).** A cytomegalovirus-encoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 7829-7834.
- SMITH, M. G. (1956).** Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease. *Proc Soc Exp Biol Med* **92**, 424-430.
- Soderberg, C., Giugni, T. D., Zaia, J. A., Larsson, S., Wahlberg, J. M. & Moller, E. (1993).** CD13 (human aminopeptidase N) mediates human cytomegalovirus infection. *J Virol* **67**, 6576-6585.
- Söderberg-Naucler, C., Fish, K. N. & Nelson, J. A. (1997).** Reactivation of Latent Human Cytomegalovirus by Allogeneic Stimulation of Blood Cells from Healthy Donors. *Cell* **91**, 119-126.
- Söderberg-Naucler, C., Streblow, D. N., Fish, K. N., Ian-Yorke, J., Smith, P. P. & Nelson, J. A. (2001).** Reactivation of Latent Human Cytomegalovirus in CD14+ Monocytes Is Differentiation Dependent. *J Virol* **75**, 7543-7554.
- Sontheimer, E. J. (2005).** Assembly and function of RNA silencing complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 127-138.
- Southern, E. M. (1975).** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-517.
- Spector, D. H. (1996).** Activation and regulation of human cytomegalovirus early genes. *Intervirology* **39**, 361-77.

- Spengler, M. L., Kurapatwinski, K., Black, A. R. & zizkhan-Clifford, J. (2002).**SUMO-1 Modification of Human Cytomegalovirus IE1/IE72. *J Virol* **76**, 2990-2996.
- Spivack, J. G. & Fraser, N. W. (1988).**Expression of herpes simplex virus type 1 latency-associated transcripts in the trigeminal ganglia of mice during acute infection and reactivation of latent infection. *J Virol* **62**, 1479-1485.
- Stern-Ginossar, N., Elefant, N., Zimmermann, A. & other authors (2007).**Host Immune System Gene Targeting by a Viral miRNA. *Science* **317**, 376-381.
- Storz, G. (2002).**An Expanding Universe of Noncoding RNAs. *Science* **296**, 1260-1263.
- Strahl, B. D. & Allis, C. D. (2000).**The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41-45.
- Streblow, D. N., Orloff, S. L. & Nelson, J. A. (2007).**Acceleration of allograft failure by cytomegalovirus. *Current Opinion in Immunology* **19**, 577-582.
- Tang, G. (2005).**siRNA and miRNA: an insight into RISCs. *Trends in Biochemical Sciences* **30**, 106-114.
- Tang, Q., Li, L. & Maul, G. G. (2005).**Mouse Cytomegalovirus Early M112/113 Proteins Control the Repressive Effect of IE3 on the Major Immediate-Early Promoter. *J Virol* **79**, 257-263.
- Tang, Q. & Maul, G. G. (2006).**Immediate Early Interactions and Epigenetic Defense Mechanisms. In *Cytomegaloviruses: Molecular Biology and Immunity*, 1 edn. Edited by Reddehase, M. J. & Lemmermann, N.
- Tang, Q. & Maul, G. G. (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.
- Taylor-Wiedeman, J., Sissons, P. & Sinclair, J. (1994).**Induction of endogenous human cytomegalovirus gene expression after differentiation of monocytes from healthy carriers. *J Virol* **68**, 1597-1604.
- Tegeler, M. (2001).** Funktionelle Analyse einer IE4-Deletionsmutante des Humanen Cytomegalovirus. Mainz: Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg Universität Mainz.
- Thompson, J., Doniger, J. & Rosenthal, L. J. (1994).**A 79 amino acid oncogene is responsible for human cytomegalovirus mtrII induced malignant transformation. *Arch Virol* **136**, 161-172.
- Varnum, S. M., Streblow, D. N., Monroe, M. E. & other authors (2004).** Identification of Proteins in Human Cytomegalovirus (HCMV) Particles: the HCMV Proteome. *J Virol* **78**, No.20 edn, pp. 10960-10966.
- Walter, E. A., Greenberg, P. D., Gilbert, M. J., Finch, R. J., Watanabe, K. S., Thomas, E. D. & Riddell, S. R. (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, D. & Shenk, T. (2005).**Human cytomegalovirus virion protein complex required for epithelial and endothelial cell tropism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 18153-18158.
- Wang, X., Huang, S. M., Chiu, M. L., Raab-Traub, N. & Huang, E. S. (2003).**Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature* **424**, 456-461.
- White, E. A., Clark, C. L., Sanchez, V. & Spector, D. H. (2004).**Small Internal Deletions in the Human Cytomegalovirus IE2 Gene Result in Nonviable Recombinant Viruses with Differential Defects in Viral Gene Expression. *J Virol* **78**, 1817-1830.

- Wilfinger, W. W., Mackey, K. & Chomczynski, P. (1997).**Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques* **22**, 474-476.
- Wolff, D., Jahn, G. & Plachter, B. (1993).**Generation and effective enrichment of selectable human cytomegalovirus mutants using site-directed insertion of the neo gene. *Gene* **130**, 167-173.
- Wright, E., Bain, M., Teague, L., Murphy, J. & Sinclair, J. (2005).**Ets-2 repressor factor recruits histone deacetylase to silence human cytomegalovirus immediate-early gene expression in non-permissive cells. *J Gen Virol* **86**, 535-544.
- Wright, J. F., Kurosky, A. & Wasi, S. (1994).**An endothelial cell-surface form of annexin II binds human cytomegalovirus. *Biochem Biophys Res Commun* **198**, 983-989.
- Wu, T. T., Su, Y. H., Block, T. M. & Taylor, J. M. (1998).**Atypical Splicing of the Latency-Associated Transcripts of Herpes Simplex Type 1. *Virology* **243**, 140-149.
- Xu, Y., Ahn, J. H., Cheng, M., apRhys, C. M., Chiou, C. J., Zong, J., Matunis, M. J. & Hayward, G. S. (2001).**Proteasome-Independent Disruption of PML Oncogenic Domains (PODs), but Not Covalent Modification by SUMO-1, Is Required for Human Cytomegalovirus Immediate-Early Protein IE1 To Inhibit PML-Mediated Transcriptional Repression. *J Virol* **75**, 10683-10695.
- Yamamoto, T., Suzuki, S., Radsak, K. & Hirai, K. (1998).**The UL112/113 gene products of human cytomegalovirus which colocalize with viral DNA in infected cell nuclei are related to efficient viral DNA replication. *Virus Research* **56**, 107-114.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985).**Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.
- Yeager, A. S., Grumet, F. C., Hafleigh, E. B., Arvin, A. M., Bradley, J. S. & Prober, C. G. (1981).**Prevention of transfusion-acquired cytomegalovirus infections in newborn infants. *J Pediatr* **98**, 281-287.
- Yu, D., Silva, M. C. & Shenk, T. (2003).**Functional map of human cytomegalovirus AD169 defined by global mutational analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12396-12401.
- Yu, Y. & Alwine, J. C. (2002).**Human Cytomegalovirus Major Immediate-Early Proteins and Simian Virus 40 Large T Antigen Can Inhibit Apoptosis through Activation of the Phosphatidylinositolide 3'-OH Kinase Pathway and the Cellular Kinase Akt. *J Virol* **76**, 3731-3738.
- Zuker, M. (2003).**Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucl Acids Res* **31**, 3406-3415.

6. Anhang

6.1. Verwendete Oligonukleotide

SYBR-GREEN Real-Time PCR:

Cyclophilin-fwd-1	5'-CCC ACC GTG TTC TTC GAC AT-3'	(Prichard <i>et al.</i> , 2001)
Cyclophilin-rev-1	5'-TCT TTG GGA CCT TGT CTG CAA-3'	(Prichard <i>et al.</i> , 2001)
IE1-Taq-fwd-1	5'-TGA CCG AGG ATT GCA ACG A-3'	
IE1-Taq-rev-1	5'-TGA TTC TAT GCC GCA CCA TGT-3'	
IE2-Taq-fwd-1	5'-GTG ACC GAG GAT TGC AAC GA-3'	
IE2-Taq-rev-4	5'-CGG CAT GAT TGA CAG CCT G-3'	(White <i>et al.</i> , 2004)
UL112/113-Taq-fwd-1	5'-CGC CAG TTC GTC TTC GAT AC-3'	
UL112/113-Taq-rev-1	5'-CCG AGG AGA CGG ATT TGT TG-3'	
UL97-Taq-fwd-1	5'-TGT GCG ATT ACA GCC TCA G-3'	
UL97-Taq-rev-1	5'-GCT CCG ACA TGC AAT AAC G-3'	
UL54-Taq-fwd-1	5'-CAC TTT GCC GAT GTA ACG TTT C -3'	
UL54-Taq-rev-1	5'-TTT TTG TGG AGC CCG TCA AG-3'	
UL44-Taq-fwd-1	5'-GCT GTC GCT CTC CTC TTT CG-3'	
UL44-Taq-rev-1	5'-TCA CGG TCT TTC CTC CAA GG-3'	
UL4-Taq-fwd-1	5'- TGT TTT TGG GAC TTG TTC AAT CG -3'	
UL4-Taq-rev-1	5'-TCT GAC GGT CGG GAG ACT TC-3'	
US11-fwd-1	5'-TGC AGC CAA CCT TTC ACA TAC AG -3'	
US11-rev-1	5'-CGG CGC AGT ATA CGC TGA TG-3'	

TaqMan Real Time PCR:

pUL54-fwd-1	5'-TCA TCT ACG GGG ACA CGG AC-3'
pUL54-rev-1	5'-TGC GCA CCA GAT-3'
TaqMan-CMV (Sonde)	5'-[FAM] CCA CTT TGC CGA TGT AAC GTT TCT TGC AT [TAMRA]-3'

RT-PCR:

IE4-fwd	5'-CCG TCC CAG TCC GCC GCC CAA CTG CGC-3'
IE4-rev10	5'-GTC TAT CCC CAA AAA AAC ACA CAC CGT CAG GGA ACA-3'
S1-fwd	5'-TCT TTA TCG TCG TCG TCG CCG GCT TCG-3'
S2-fwd	5'-CGA CGC AAC GTG GTT AAA CAG-3'
S4-fwd	5'-GAT CAC ACC GCA CGC TAT AGA C-3'
S5-fwd	5'-GAA CCC GTA CCG AAG AAA AGT TCC-3'
S6-fwd	5'-CCA CCA CAT CAC TTT CTG-3'
S2-rev	5'-GTG TCT CCG TGA CGG TAC TTA TC-3'
S6-rev	5'-CGT ACA AGA ACC ACG TTG TC-3'
vIL10RTfwd	5'-ATG CTG TCG GTG ATG GTC TC-3'
vIL10RTrev	5'-CTT CGA GAC GGC TAA ACA ACG-3'

Klonierungen:

FRT-Kan-fwd	5'-AAG TTC CTA TTC TCT AGA AAG TAT AGG AAC TTC AGA GCG CTT TTG AAG CTG GG-3'
FRT-Kan-rev	5'-GAA GTT CCT ATA CTT TCT AGA GAA TAG GAA CTT CGG AAT AGG AAC TTC AAG ATC CCC C-3'
pKK-IE4-fwd	5'-GCT AGC CGC CTA GCA ACA CCC ACA AAC AAC GTC-3'
pKK-IE4-rev	5'-CCA CCT ACC TGG GAC GCG CAG TTG GG-3'
IE4-Flag-fwd	5'-GGC TAG CAT GGA CTA CAA GGA CGA CGA TGA CAA GCC GTC CCA GTC CGC CGC CCA ACT GCG C-3'
RACE_IE4	5'- CAG GCA GTA GAT ACC AGA TTC TCC GAC G-3'

***In vitro* Transkription:**

T7	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3'
----	-----------------------------------

BAC-Mutagenese:**pBAC-KK-1:**

Amp-IE4-fwd	5'-AAT TGA AAC CTA TCG ATA GGC GTA TAT CGA GGA TTC ATC ATC AGG TGG CACTTT TC-3'
Amp-IE4-rev	5'-TAA CAA CAA AAA TAG CGA CTA GAT ACA CCA CGG ACA ATC TCT TGG TCT GAC AGT TAC C-3'

pBAC-KK-3:

Donor-Amp-FRT-fwd 5'-AAA AAA TTG ACA AAA ACA TCA TAA CAT AAA GGA
CCA CCT AAG TTC CTA TAC TTT CTA GAG AAT AGG
AAC TTT CAG GTG GCA CTT TTC GGG GAA ATG-3'

Donor-Amp-FRT-rev 5'-CGC AGC ATG CCG TCC CAG TCC GCC GCC CAA
CTG CGC GTC CAA GTT CCT ATT CTC TAG AAA GTA
TAG GAA CTT ACT TGG TCT GAC AGT TAC CAA TGC
TTA ATC-3'

pBAC-KK-4:

Intron-Amp-FRT-fwd 5'-GGC TGA CAG TCG ACG GGT GGT ACC TGC AAG
AGA AGA AAC CCA AGT TCC TAT ACT TTC TAG AGA
ATA GGA ACT TTC AGG TGG CAC TTT TCG GGG AAA
TG-3'

Intron-Amp-FRT-rev 5'-GCC GTC CCA GTC CGC CGC CCA ACT GCG CGT
CCC AGG TAG GTA AGT TCC TAT TCT CTA GAA AGT
ATA GGA ACT TAC TTG GTC TGA CAG TTA CCA ATG
CTT AAT C-3'

pBAC-KK-5:

IL10-Amp-FRT-fwd 5'-TAT CCG ATT TCC TTT CCG CCT CCT GAG ACA GCC
GAC TAA TCA AGT TCC TAT ACT TTC TAG AGA ATA
GGA ACT TCA GGT GGC ACT TTT CGG GGA AAT G-3'

IL10-Amp-FRT-rev 5'-CGC GCA GTT GGG CGG CGG ACT GGG ACG GCA
TGC TGC GGC GAA GTT CCT ATT CTC TAG AAA GTA
TAG GAA CTT ACT TGG TCT GAC AGT TAC CAA TGC
TTA ATC-3'

Sequenzierung:**pBAC-KK-1:**

Amp-Test-fwd 5'-GCG AAT GAG CAG CTA GGC TTG G-3'

Amp-Test-rev 5'-TTC ACC AGC GTT TCT GGG TGA G-3'

Amp-Test-rev2 5'-TGA CAC CAC GAT GCC TGT AGC A-3'

pBAC-KK-2:

Kan-Test-fwd 5'-TGT TCC GCT TCC TTT AGC AG-3'

Kan-Test-rev 5'-GGG ATC TCA TGC TGG AGT TC-3'

RACE_IE4 5'- CAG GCA GTA GAT ACC AGA TTC TCC GAC G-3'

FRT-check-fwd 5'-TCG TGT GGT GGC TTT ATC-3'

FRT-check-rev 5'-AAG CAG CCA CTC TAA CCA TC-3'

pBAC-KK-3:

BP4 5'-TCG TCT TGA TCT CCA GCC GGA GAC AAC GGC-3'

pBAC-KK-4:

S1-fwd 5'-TCT TTA TCG TCG TCG TCG CCG GCT TCG-3'

pBAC-KK-5:

S2-fwd 5'-CGA CGC AAC GTG GTT AAA CAG-3'

BP4 5'-TCG TCT TGA TCT CCA GCC GGA GAC AAC GGC-3'

pKK-IE4:

BGH3.1 5'-TAG AAG GCA CAG TCG AGG-3'

Primer zur Herstellung von DIG-Sonden (Northern Blotting, Southern Blotting):**Sonde #2:**

IE4-For2 5'-CCT CGA TAT ACG CCT ATC GAT AGG-3'

IE4-Rev2 5'-GCT CCT TCG TGG GCA TGC TTT CGC-3'

Sonde #3:

IE4-For3 5'-GTC GGA GAA TCT GGT ATC TAC TGC CTG-3'

IE4-Rev4 5'-GGC GGC GCT GTT TGT TGT TTG GAT G-3'

Sonde #4:

IE4-For6 5'-CCA AAC AAC AAA CAG CGC CGC CG-3'

IE4-Rev3 5'-CCT AAC ATC ATG ACT ATT CAG ACT ATG GC-3'

Sonde #5:

IE4-For7 5'-GCC ATA GTC TGA ATA GTC ATG ATG TTA GG-3'

IE4-Rev11 5'-GAC GTT TGC GGA TCG GCT CGC GGG TGT GTG G-3'

Ampicillin:

Amp-fwd 5'-TCA GGT GGC ACT TTT C-3'

Amp-rev 5'-CTT GGT CTG ACA GTT ACC-3'

IE4-1 (Exon 1):

S2-fwd 5'-CGA CGC AAC GTG GTT AAA CAG-3'

pKK-IE4-rev 5'-CCA CCT ACC TGG GAC GCG CAG TTG GG-3'

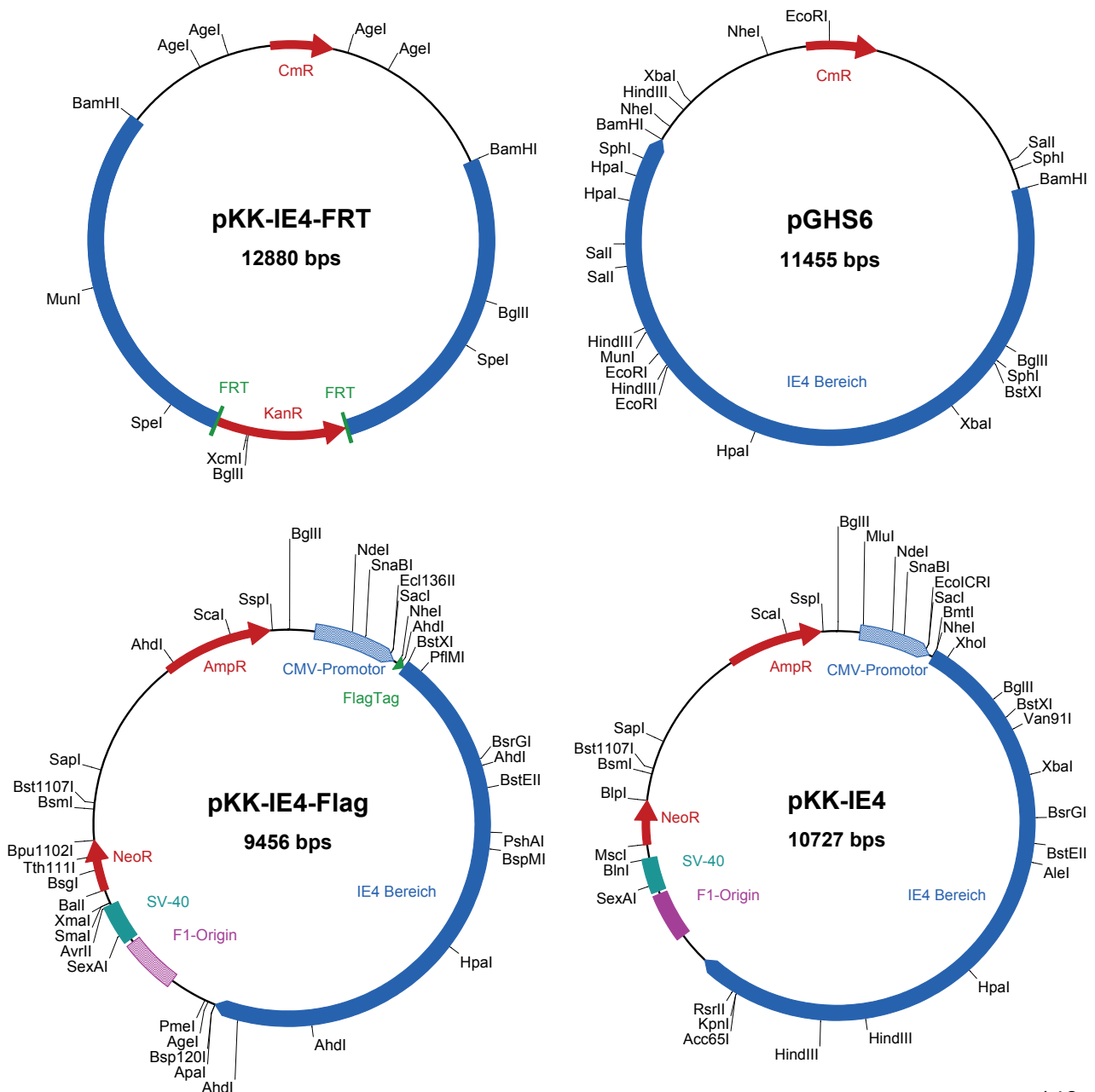
IE4- 2 (Exon 2):

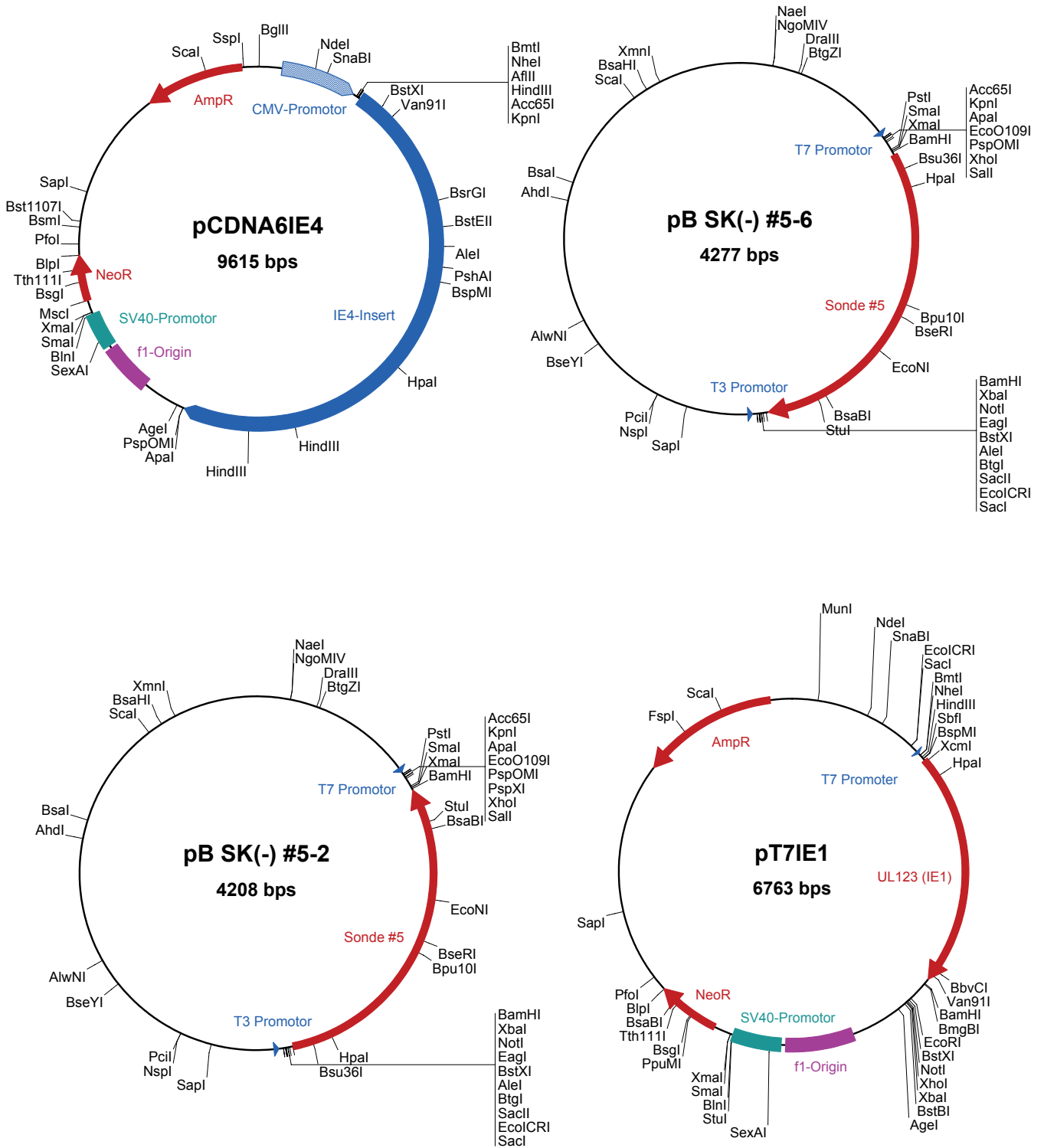
IE4-fwd 5'-CCG TCC CAG TCC GCC GCC CAA CTG CGC-3'

IE4-rev10 5'-GTC TAT CCC CAA AAA AAC ACA CAC CGT CAG GGA
ACA-3'**vIL10 cDNA:**

vIL10RTfwd 5'-ATG CTG TCG GTG ATG GTC TC-3'

vIL10RTrev 5'-CTT CGA GAC GGC TAA ACA ACG-3'

6.2. Plasmidkarten



7. Abkürzungsverzeichnis

6-FAM	6-Carboxy-Fluorescein
aa	Aminosäure, <i>amino acid</i>
Abb.	Abbildung
AIDS	Erworbenes Immundefektsyndrom (<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>)
AmpR	Ampicillinresistenz
AP	<i>Assembly Protein</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>
bp	Basenpaare
CSPD	Disodium 3-(4-methoxyspiro (1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)-tricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]decan)-4-yl) phenyl phosphate
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
E	<i>Early</i> , „früh“
EBV	Eppstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	<i>ER Golgi Intermediate Compartment</i>
Fa.	Firma
FKS	fötales Kälberserum
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
gp	Glykoprotein
HAART	<i>highly active antiretroviral therapy</i>
HCMV	Humanes Cytomegalovirus
HFF	humane Vorhautfibroblasten, <i>Human foreskin fibroblasts</i>

HHV	Humanes Herpesvirus
HSCT	<i>Haematopoetic Stem Cell Transplantation</i>
HSV	Herpes Simplex Virus
IE	<i>Immediate Early</i> , „sehr früh“
IFN	Interferon
IL-10	Interleukin 10
IR	<i>Internal Repeat</i>
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasenpaare, <i>kilobases</i>
L	<i>Late</i> , „spät“
MCP	<i>Major Capsid Protein</i>
mind.	mindestens
MOI	<i>Multiplicity Of Infection</i> , Infektionsstärke
NeoR	Neomycinresistenz
NIEPs	Nicht-infektiöse umhüllte Viruspartikel, <i>non infectious enveloped particles</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nt	Nukleotide
OD	Optische Dichte
ORF	<i>Open Reading Frame</i> , offener Leserahmen
p.i.	Nach Infektion, <i>post infection</i>
pAP	<i>Precursor Assembly Protein</i>
PBS	<i>Phosphate buffered Saline</i>
pgk	Phosphoglyceratkinase
pp	Phosphoprotein
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RLU	<i>Relative Light Units</i> , Maßeinheit für Lumineszenz
RNA	Ribonukleinsäure
RQ	Relative Quantität, Maß für relative Unterschiede der Transkriptmengen in quantitativer <i>Real-Time</i> RT-PCR
RT	Raumtemperatur

RT	Raumtemperatur
SCP	<i>Small Capsid Protein</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SOT	<i>Solid Organ Transplantation</i>
TAMRA	6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin
TR	<i>Terminal Repeat</i>
UL	Unique _{Long} , Abschnitt des HCMV-Genoms
ÜN	Über Nacht
unv.	unverdünnt
Upm	Umdrehungen pro Minute
US	Unique _{Short} Abschnitt des HCMV-Genoms
v/v	Volumen/Volumen
VTA	<i>Viral Trans Activator</i>
VZV	Variozello Zoster Virus
w/v	Gewicht/Volumen (<i>weight/volume</i>)
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
MCMV	murines CMV
mock	Negativkontrolle bei Infektionsexperimenten
ZNS	Zentrales Nervensystem

Lebenslauf

Zur Person

Name Kai Alexander Kropp

Anschrift Rheinstrasse 101
55116 Mainz

Geburtstag 26.09.1977

Geburtsort Neustadt a. d. Weinstrasse

Staatsangehörigkeit deutsch

Schulbildung

1988-1997 Leibniz-Gymnasium in Neustadt a. d. Weinstrasse

1997 Abitur am Leibniz-Gymnasium in Neustadt a. d. Weinstrasse
Note: 2,5

Wehrdienst

1997-1998 2. Panzerartillerielehrbataillon 345, Kusel

Studium

1998-2003 Studium der Biologie an der Universität Kaiserslautern

2002 Diplomprüfung
Hauptfach: Genetik
Nebenfächer: Tierphysiologie, Biochemie

2002-2003 Diplomarbeit in der Abteilung Genetik der Universität
Kaiserslautern unter der Leitung von Herrn HD Dr. Matthias
Redenbach (Institutsleitung: Herr Prof. Dr. John Cullum)

Thema der Diplomarbeit:
„Charakterisierung von gentechnisch veränderten SCP-1
Molekülen in *Streptomyces coelicolor* M138“

Studium (Fortsetzung)

Mai 2003 Diplom in Biologie
Note: sehr gut (1,4)

Promotion

Seit Juni 2003 Promotion am Institut für Virologie der Universität Mainz unter
der Betreuung von Prof. Dr. Bodo Plachter