

**Analyse der Cytomegalovirus-Infektion in
Adenovirus Typ 5 E1A/E1B-transformierten Zellen
zur Entwicklung eines Zellsubstrats für die
Impfstoffproduktion**

Dissertation

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
im Promotionsfach Chemie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Natascha Krömmelbein

geboren am 25. November 1984
in Limburg an der Lahn

Mainz 2016

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 07.04.2016

D77 (Dissertation Johannes Gutenberg Universität Mainz)

Zusammenfassung

Das humane Cytomegalovirus (HCMV) ist ein weit verbreiteter Krankheitserreger, der insbesondere bei Neugeborenen und Patienten mit eingeschränktem Immunsystem lebensbedrohliche Erkrankungen verursacht. Aufgrund der klinischen Relevanz wird der Entwicklung eines HCMV-Impfstoffs höchste Priorität zugeordnet. Nicht-infektiöse, subvirale Partikel, so genannte *Dense Bodies* (DBs), stellen aufgrund ihrer Immunogenität eine vielversprechende Basis für die Entwicklung eines HCMV-Impfstoffes dar. *In vitro* werden DBs in großen Mengen von infizierten, primären Fibroblasten (HFF) freigesetzt und können anschließend aus Zellkulturüberstand aufgereinigt werden. Primärzellkulturen wie HFF sind jedoch für die Impfstoff-Herstellung mit einer Reihe von Problemen behaftet. Zelllinien, die durch transformierende Funktionen onkogener Viren immortalisiert sind, stellen ein attraktives, alternatives Zellsubstrat zur Impfstoff-Herstellung dar. Die bislang untersuchten, derartigen Linien hatten sich jedoch einer produktiven HCMV-Vermehrung und, damit verbunden, einer DBs-Produktion gegenüber als resistent erwiesen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die von Cevec Pharmaceuticals GmbH zur Verfügung gestellte Zelllinie CAP, die mit den Adenovirus Typ 5 Proteinen E1A und E1B immortalisiert ist, auf die Fähigkeit hin zu untersuchen, HCMV zu replizieren und neben infektiösen Viren auch DBs in den Zellkulturüberstand freizusetzen. Die ersten Untersuchungen zeigten, dass HCMV CAP-Zellen effizient infizieren kann und seine *immediate early* (IE)-Gene exprimiert. In der Tat konnten infektiöse Virusnachkommen und DBs im Zellkulturüberstand infizierter CAP-Zellen nachgewiesen werden. Damit wurde erstmalig HCMV-Vermehrung in einer durch adenovirale Proteine transformierten Zelllinie gezeigt. Die dabei freigesetzten Mengen an DBs und infektiösen Virionen, lagen allerdings deutlich unter denen, die aus Überständen von HFF-Kulturen erhalten wurden. In den folgenden Untersuchungen sollten die Ursachen für diese Diskrepanz aufgeklärt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die HCMV-Infektion in CAP-Zellen zu einer Auflösung von sog. ND10-Domänen führt. Diese Strukturen sind Teil der angeborenen, antiviralen Abwehrsysteme der Zelle. Erst ihre Auflösung ermöglicht die virale Vermehrung. Im Weiteren konnte virale *early* und auch *early-late* Geneexpression, wie auch virale DNA-Replikation in CAP-Zellen nachgewiesen werden. Dies zeigte, dass die grundlegenden Mechanismen der permissiven HCMV-Infektion von CAP-Zellen unterstützt werden. Jedoch fanden sich auch hier deutliche, quantitative Unterschiede zu HFF. Ausdruck der begrenzten Replikation viraler Genome und eingeschränkter Expression viraler Strukturproteine war die niedrige Anzahl an Viruspartikeln, die in elektronenoptischen Untersuchungen in CAP-Zellen gefunden wurden. Weiterführende Untersuchungen deuteten darauf hin, dass Unterschiede in der Zellzyklus-Kontrolle zwischen CAP-Zellen und HFF für den Unterschied in der Produktivität gegenüber Virusvermehrung verantwortlich sein könnten. Die Eigenschaft der adenoviralen E1-Proteine zur Stimulation des Zellzyklus wurde als möglicherweise hemmend für die HCMV-Replikation identifiziert. So konnte gezeigt werden, dass sich CAP-Zellen zum Zeitpunkt der Virusinfektion bevorzugt in der S-Phase des Zellzyklus befinden. Die S-Phase ist primär restriktiv für die initiale Genexpression und Replikation von HCMV. Zusammenfassend deuteten die Ergebnisse darauf hin, dass die Expression der adenoviralen E1-Proteine in CAP-Zellen die HCMV-Replikation nicht verhindern, aber durch Einflussnahme auf verschiedene Funktionen der Wirtszelle hemmen. Die gezielte Modifikation der E1A/E1B Funktionen bietet einen attraktiven Ansatz, die HCMV-Infektion in CAP-Zellen gezielt zu unterstützen. Diese Arbeit hat somit wichtige Erkenntnisse erbracht, die als Grundlage für die Anpassung von HCMV an CAP-Zellen und die Optimierung der Produktion von DBs dienen.

Summary

The human cytomegalovirus (HCMV) is a ubiquitous pathogen which causes severe disease manifestations both in newborns and in immunocompromised individuals. Because of the clinical relevance, the development of a vaccine against HCMV has gained top priority in biomedical research. The immunogenicity of non-infectious subviral particles, so called *Dense Bodies* (DBs), renders them a promising basis for vaccine development. DBs are released in large amounts in vitro from infected primary fibroblasts (HFF) and can easily be purified from HFF culture supernatants by gradient centrifugation. Vaccine production in primary cell cultures like HFF is, however, associated with several restrictions. Permanent cell lines established by transfection of the transforming functions of DNA tumor viruses provide an attractive, alternative cell substrate for vaccine manufacturing. The lines that had been tested for this purpose thus far have, however, been notoriously resistant to HCMV replication and progeny production. The main goal of this work was to test the CAP cell line for its suitability to replicate HCMV and to release infectious virus as well as DBs. CAP cells were provided by Cevec Pharmaceuticals GmbH. They had been immortalized by the adenovirus type 5 early proteins E1A and E1B. Initial testing showed that HCMV was able to efficiently penetrate CAP cells and to start its *immediate early* (IE) gene expression. Infectious virus could indeed be detected in the culture supernatants of CAP cells. This was the first time that productive infection of HCMV could be demonstrated in cells transformed by adenoviral proteins. The infectious titer and the number of DBs were, however, substantially lower compared to what was normally seen in HFF cultures. Subsequent analyses were therefore conceived to address the reasons for this discrepancy. It could be demonstrated that HCMV infection of CAP cells leads to the disruption of ND10 domains. These structures are part of the innate, antiviral response and their dissolution is a prerequisite for the initiation of productive HCMV infection. Viral *early* and *early-late* gene expression could be demonstrated in further analyses. This showed that the basic mechanisms of permissive HCMV infection are supported by CAP cells. There were, however, again marked quantitative differences to HFF infection noted. A reflection of the restricted replication of viral genomes and the low-level expression of viral structural proteins was the low number of viral particles that were detectable in late-stage infected CAP cells by electron microscopy. Further analyses indicated that differences in cell-cycle control between CAP cells and HFF were at least in part responsible for the low productivity of the former. The cell cycle stimulation mediated by adenoviral E1-proteins was identified as being putatively inhibitory to HCMV replication in CAP cells. It could be demonstrated that CAP cells were preferentially cycling through S-phase at the time of HCMV infection. The S-phase is, however, restrictive to *immediate-early* gene expression of HCMV, thus preventing high level viral replication. These results showed that adenoviral E1-proteins expressed in CAP cells do not block HCMV infection. Yet their influence on the host cell at various levels is likely restrictive to HCMV replication. Targeted intervention with E1A/E1B functions may provide an attractive strategy to support HCMV replication in CAP cells. This work has provided valuable knowledge for the adaptation of HCMV on CAP cells and for the optimization of DBs-production in these cultures.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1 Das humane Cytomegalovirus.....	1
1.1.1 Replikationszyklus und Morphogenese.....	2
1.1.2 Klinische Relevanz	4
1.2 Impfstoffentwicklung.....	5
1.2.1 Klinische Relevanz einer Vakzine gegen HCMV.....	5
1.2.2 Impfstoffkandidaten	6
1.2.2.1 Lebend attenuierte Viren	6
1.2.2.2 Totantigene und Vektorexpressionssysteme	7
1.2.2.3 Subvirale Partikel – <i>Dense Bodies</i>	8
1.2.3 Herstellung von Impfstoffen	8
1.3 Immortalisierte Zelllinien.....	9
1.3.1 Spontan immortalisierte Zelllinien	10
1.3.1.1 Madin-Darby Hundenierenzellen (MDCK; Madin-Darby <i>Canine Kidney Cells</i>).....	10
1.3.1.2 Vero Zellen.....	10
1.3.1.3 Babyhamsternierenfibroblasten (BHK-21 (C-13); <i>Baby Hamster Kidney</i>).....	11
1.3.1.4 Eierstockzellen des chinesischen Hamsters (CHO; <i>Chinese Hamster Ovary</i>).....	11
1.3.2 Designer-Zelllinien.....	12
1.3.2.1 PER.C6	12
1.3.2.2 Cevec's Amniozyten-basierte Produktionszelllinie (CAP; <i>Cevec's amniocyte production</i>)	13
1.4 Zielsetzung.....	15
2. Material und Methoden.....	16
2.1 Allgemeine Laborgeräte	16
2.2 Verbrauchsmaterialien und Plastikware.....	19
2.3 Chemikalien, Zusätze und Lösungen.....	23
2.4 Kits.....	30
2.5 Kultivierungsbedingungen von Säugerzellen	30
2.5.1 Puffer und Lösungen	31
2.5.2 Medien und Medienzusätze	31

2.5.3	Antibiotika.....	32
2.5.4	Zellen und Zelllinien.....	32
2.5.5	Bestimmung der Zellzahl und der Zellvitalität.....	34
2.5.6	Kryokonservierung und Reaktivierung von Zellen	34
2.6	Anzuchtbedingungen von Viren.....	34
2.6.1	Lösungen und Zusätze	34
2.6.2	Virusstämme	35
2.6.3	Infektion eukaryotischer Zellen mit HCMV	37
2.6.3.1	Infektion adhärenter, eukaryotischer Zellen mit HCMV	37
2.6.3.2	Infektion eukaryotischer Suspensionszellen mit HCMV	37
2.6.3.3	Behandlung infizierter Zellen mit Phosphonoessigsäure (PAA; <i>Phosphonoacetic acid</i>)	38
2.6.4	Herstellung virushaltiger Zellkulturüberstände	38
2.6.5	Bestimmung des Virustiters über IE1-positive Zellen	38
2.6.6	Aufreinigung viraler Partikel aus Zellkulturüberstand	39
2.7	Molekularbiologische Methoden	41
2.7.1	Isolierung von DNA.....	41
2.7.1.1	Isolierung viraler DNA aus infizierten Zellen bzw. aus Zellkulturüberstand.....	41
2.7.2	Quantitative <i>real-time</i> PCR (Taqman™ PCR; qPCR).....	41
2.7.2.1	Durchführung einer qPCR	41
2.7.3	Antikörper.....	43
2.7.3.1	Antikörper für die Durchflusszytometrie	43
2.7.3.2	Antikörper für die Immunfluoreszenz	44
2.7.3.3	Antikörper für den Western-Blot	44
2.7.3.4	Antikörper für die alkalische Phosphatase-anti-alkalische Phosphatase-Färbung.....	45
2.7.3.5	Antikörper für die Bestimmung des Virustiters über IE1-positive Zellen	46
2.7.4	Durchflusszytometrie	46
2.7.4.1	Puffer und Lösungen	46
2.7.4.2	Durchführung	47
2.7.5	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	48
2.7.6	Gelelektrophorese	48
2.7.6.1	Puffer und Lösungen	48
2.7.6.2	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS- PAGE).....	49
2.7.6.3	Bis-TRIS-PAGE.....	49
2.7.7	Silberfärbung.....	50

2.7.8	Westernblot	50
2.7.8.1	Puffer und Lösungen	50
2.7.8.2	Durchführung	50
2.7.9	Indirekte Immunfluoreszenz.....	51
2.7.10	Zytospin.....	52
2.7.11	APAAP-Färbung.....	52
2.7.11.1	Puffer und Lösungen	52
2.7.11.2	Durchführung	53
2.7.12	Luciferase-Assay.....	53
2.8	Transmissionselektronenmikroskopie.....	54
3.	Ergebnisse	56
3.1	Entwicklung eines zytopathischen Effekts nach Infektion mit HCMV	56
3.2	Penetration von HCMV in CAP-Zellen	57
3.2.1	Nachweis der HCMV-Infektion von CAP-Zellen durch Luciferase-Expression.....	57
3.2.2	Analyse der initialen Infektionsereignisse durch Transmissionselektronenmikroskopie.....	58
3.2.3	Analyse der Infektionseffizienz von CAP _{adh.} mit HCMV-Laborstämmen.....	60
3.3	Freisetzung von Nachkommen-Viren nach Infektion mit HCMV.....	62
3.3.1	Qualitativer Nachweis der Virusfreisetzung aus CAP _{adh.}	62
3.3.2	Quantitative Analyse der Virus-Genomfreisetzung aus CAP-Zellen mit Hilfe der qPCR	63
3.3.3	Virustitration der aus CAP _{adh.} freigesetzten Virionen zu späten Zeitpunkten der Infektion.....	66
3.4	Analyse der initialen Ereignisse in CAP-Zellen nach HCMV-Infektion.....	68
3.4.1	Analyse der IE1-Expression HCMV-infizierter CAP _{adh.} und CAP _{sus.}	68
3.4.2	Analyse der Auflösung zellulärer ND10-Domänen in HCMV infizierten CAP _{adh.}	69
3.5	Genexpression früher und später viraler HCMV-Proteine in CAP-Zellen	72
3.5.1	UL16- und UL84-Promotoraktivität in infizierten CAP-Zellen.....	72
3.5.2	Expression der prozessiven Untereinheit UL44 der viralen DNA-Polymerase in infizierten CAP _{adh.} und CAP _{sus.}	75
3.5.3	Expression des <i>early-late</i> Phosphoproteins pp65 in CAP-Zellen	77
3.5.4	Untersuchung der Synthese des späten Proteins pp28 in HCMV-infizierten CAP _{adh.}	79
3.6	Replikation viraler DNA in HCMV-infizierten CAP _{adh.} und CAP _{sus.}	80
3.7	Analyse der Morphogenese viraler Partikel in HCMV-infizierten CAP-Zellen.....	82
3.7.1	Nachweis neusynthetisierter, viraler Kapside in infizierten CAP _{adh.} und CAP _{sus.} mittels TEM.....	82

3.7.2	Analyse der viralen Partikelmorphogenese im Zytoplasma infizierter CAP _{adh.} mittels TEM.....	83
3.8	Analyse der aus HCMV-infizierten CAP _{adh.} freigesetzten Viruspartikel.....	85
3.9	Einfluss der adenoviralen Proteine E1A und E1B auf die HCMV-Infektion in CAP-Zellen.....	87
3.9.1	Expression des adenoviralen Proteins E1A in CAP _{adh.} , CAP _{sus.} und HEK293.....	87
3.9.2	Stimulation der E1A-Expression durch die HCMV-Infektion.....	88
3.9.3	Zellzyklusanalyse nicht infizierter CAP _{adh.} , CAP _{sus.} und HEK293 zur Bestimmung der Zellzyklusphase unmittelbar vor HCMV-Infektion.....	89
3.9.4	Analyse der Expression viraler Gene in unterschiedlichen Zellzyklusphasen von CAP _{sus.}	91
4.	Diskussion.....	95
4.1	Penetration von HCMV in CAP-Zellen.....	96
4.2	Analyse der initialen Ereignisse in CAP-Zellen nach HCMV-Infektion.....	97
4.3	Genexpression früher und später viraler HCMV-Proteine in CAP-Zellen.....	98
4.4	Replikation viraler DNA in HCMV-infizierten CAP _{adh.} und CAP _{sus.}	100
4.5	Analyse der Morphogenese viraler Partikel in HCMV-infizierten CAP-Zellen.....	101
4.6	Freisetzung von Nachkommen-Viren nach Infektion mit HCMV.....	102
4.7	Analyse der aus HCMV-infizierten CAP _{adh.} freigesetzten Viruspartikel.....	104
4.8	Einfluss der adenoviralen Proteine E1A und E1B auf die HCMV-Infektion in CAP-Zellen.....	105
4.9	Resümee.....	107
5.	Literaturverzeichnis.....	108
	Danksagung.....	128
	Erklärung.....	129
	Lebenslauf.....	130

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µL	Mikroliter
Abb.	Abbildung
adh.	adhärent
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol
AF	Alexa Fluor
Amp	Ampicillin
AmpR	Ampicillinresistenz-Kassette
APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARPE-19	<i>adult retinal pigment epithelium-19</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BAC	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BHK	<i>Baby Hamster Kidney</i>
bp	<i>base pairs</i> (Basenpaare)
BSA	<i>bovine serum albumine</i> (Rinderserum-Albumin)
bzw.	beziehungsweise
ca	circa
CAP	<i>Cevec's Amniocyte Production</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CEF	<i>Chick Embryo Fibroblast</i>
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
CPE	<i>cytopathic effect</i> (zytopathischer Effekt)
d	<i>day(s)</i> (Tag(e))
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DB	<i>Dense Body</i>
DBs	<i>Dense Bodies</i>
DEPC	Diethyldicarbonat
DMEM:F12	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12</i>
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)

dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	<i>early</i> (früh nach Infektion)
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EBV	Epstein Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EdU	<i>5-Ethynyl-2-deoxyuridine</i>
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	<i>ER-Golgi intermediate compartment</i>
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> (Durchflusszytometrie)
FAM	6-Carboxyfluorescein
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i> (Fluorescein)
FKS	fötales Kälberserum
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
FRT	<i>flippase recognition target</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
gB/gH/gL	Glykoprotein B/H/L
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GMP	<i>Good manufacturing practice</i> (gute Herstellungspraxis)
h	<i>hour(s)</i> (Stunde(n))
HCMV	<i>human Cytomegalovirus</i> (humanes Cytomegalovirus)
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HFF	<i>human foreskin fibroblasts</i> (humane Vorhautfibroblasten)
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykane
HSV	Herpes simplex-Virus
IE	<i>immediate early</i> (sehr früh nach Infektion)
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin
k	Kilo
KCl	Kaliumchlorid
kV	Kilovolt
L	<i>late</i> (spät nach Infektion)
LB	Luria-Bertani

LDS	<i>lithium dodecyl sulfate</i> (Lithiumdodecylsulfat)
M	Molar (Gramm pro Mol)
m.o.i.	<i>multiplicity of infection</i> (Infektionsdosis)
mAK	monoklonaler Antikörper
MDCK	Madin-Darby canine kidney
MEK	<i>Methyl Ethyl Ketone</i> (Butanon)
MEM	<i>Minimum Essential Media</i>
MFI	<i>mean fluorescence intensity</i> (mittlere Fluoreszenzintensität)
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MIE	<i>major immediate early</i>
MIEP	<i>major immediate early promotor</i>
min	<i>minute(s)</i> (Minute(n))
Mio	Millionen
mL	Milliliter
MRC-5	<i>Medical Research Council-5</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NEC	<i>nuclear envelopment compartment</i>
ng	Nanogramm
NIEPs	<i>non-infectious enveloped particles</i> (nicht-infektiöse, umhüllte Partikel)
NK	natürliche Killer
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
p.a.	pro analysi (Analysenrein)
p.i.	<i>post infection</i> (nach Infektion)
PAA	<i>Phosphonoacetic acid</i> (Phosphonoessigsäure)
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i> (Polyacrylamidgelelektrophorese)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
PML	<i>Promyelocytic leukemia protein</i> (Promyelozytenleukämieprotein)
pp	Phosphoprotein
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative <i>real-time</i> PCR
RCA	<i>Replication-competent adenovirus</i> (Replikationskompetenter Adenovirus)
RLU/s	<i>relative light units per seconds</i>

RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
ROX	6-Carboxyl-X-Rhodamin
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RSV	<i>respiratory syncytial virus</i> (Respiratorisches Syncytial-Virus)
RT	Raumtemperatur
RV	<i>recombinant virus</i> (rekombinanter Virus)
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
sec	<i>second(s)</i> (Sekunde(n))
shRNA	<i>small hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SSC	<i>side scatter</i>
sus.	Suspension
TAMRA	Tetramethylrhodamin
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TBS	<i>TRIS buffered saline</i>
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UL	<i>unique long</i>
US	<i>unique short</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	<i>volume/volume</i> (Volumen/Volumen)
vAC	<i>viral Assembly Compartment</i>
vgl.	vergleiche
VLP	Virus-like particle (Virus-ähnlicher Partikel)
VSV	Vesicular stomatitis virus (vesikuläres Stomatitis-Virus)
VZV	Varizella Zoster-Virus
w/v	<i>weight/volume</i> (Gewicht/Volumen)
WI-38	<i>Wistar Institute-38</i>
WT	<i>wild type</i> (Wildtyp)
Ω	Ohm

1. Einleitung

1.1 Das humane Cytomegalovirus

Das humane Cytomegalovirus (HCMV; *human Cytomegalovirus*) wird aufgrund seiner biologischen und morphologischen Eigenschaften der Familie der *Herpesviridae* zugeordnet (Davison et al., 2009). Zu den bekanntesten Vertretern dieser Familie gehören die Herpes simplex-Viren Typ 1 (HSV-1) und Typ 2 (HSV-2), das Varizella-Zoster-Virus (VZV) sowie das Epstein-Barr-Virus (EBV). Innerhalb der *Herpesviridae* wird weiterhin in die Subfamilien α -, β - und γ -*Herpesvirinae* unterteilt (Roizman et al., 1981). Aufgrund der strikten Wirtszellspezifität, des langen Replikationszyklus sowie des breiten Zelltropismus wird das HCMV den β -*Herpesvirinae* zugeordnet (Davison, 2010). Die für die CMV-Infektion charakteristische Vergrößerung infizierter Zellen mit nukleären Einschlusskörpern, auch Eulenaugen-Zellen genannt (Mattes et al., 2000), prägte den Begriff der Zytomegalie. In Folge einer Infektion mit HCMV kommt es zur Ausbildung einer lebenslangen, latenten Infektion, die jedoch durch Reaktivierungen unterbrochen werden kann.

Reife Virionen besitzen einen Durchmesser von ungefähr 150-200 nm und zeigen die den Herpesviren eigene, charakteristische Morphologie (Chen et al., 1999). Im Inneren des Viruspartikels befindet sich das lineare, doppelsträngige DNA-Genom (Dolan et al., 2004; Mocarski et al., 2013), welches in ein ikosaedrisches Nukleokapsid (ca. 100 nm) eingebettet ist. Das Nukleokapsid wiederum ist von einer amorphen Proteinmatrix, dem sogenannten Tegument, umgeben (Chen et al., 1999), die aus ungefähr 25 verschiedenen viralen Phosphoproteinen besteht. Das Phosphoprotein pp65 (UL83) stellt mit einer gesamten Proteinmasse von 15% dabei den Hauptbestandteil des Teguments dar (Varnum et al., 2004; Reyda et al., 2014a, b). Nach außen ist das Virion durch eine Lipid-Doppelmembran abgegrenzt, in die mehrere Glykoproteine eingelagert sind (Caposio et al., 2013; Mocarski et al., 2013). Diesen Hüllproteinen werden entscheidende Funktionen bei Adsorption und Penetration von HCMV zugeschrieben.

Mit 230-240 kbp zählt das virale Genom von HCMV zu den größten aller humanpathogenen Viren. Mit den 150-200 offenen Leserahmen (ORFs; *open reading frames*), die für HCMV annotiert wurden, besitzt es eine ausgesprochen hohe Kodierungskapazität (Chee et al., 1990; Davison et al., 2003; Dolan et al., 2004). Durch Regulation alternativer Transkriptionsstartpunkte und alternativem Spleißen könnte diese Kodierungskapazität jedoch weit höher liegen (Stern-Ginossar et al., 2012).

1.1.1 Replikationszyklus und Morphogenese

Das HCMV weist einen ausgesprochen breiten Zelltropismus auf. Es repliziert in einer Vielzahl verschiedener Zellen. Prädominante Ziele für die Infektion sind jedoch Fibroblasten, Epithelzellen, Endothelzellen sowie glatte Muskelzellen (Myerson et al., 1984; Ibanez et al., 1991; Sinzger et al., 2000; Adler et al., 2013).

Im Zuge einer produktiven Infektion kommt es zunächst zur Adsorption des Virions an die Zellmembran der Wirtszelle. Über eine unspezifische Bindung der viralen Glykoproteine gM/gN und/oder gB an zelluläre Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) heftet sich das Virion zunächst an die Zellmembran der Wirtszelle an (Kari et al., 1992; Compton et al., 1993; Kari et al., 1993). In einem weiteren Schritt wird diese Bindung durch die Interaktion weiterer Glykoproteine bzw. Glykoproteinkomplexe (gH/gL/gO) mit zelltypspezifischen Rezeptoren verstärkt (Isaacson et al., 2009; Adler et al., 2013). Als mögliche Rezeptoren werden Annexin II (Wright et al., 1994; Wright et al., 1995), CD13 (Soderberg et al., 1993), Integrine (Feire et al., 2004; Wang et al., 2005b), MHC-Klasse-I-Moleküle (Beersma et al., 1990; Beersma et al., 1991) sowie der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) diskutiert (Wang et al., 2003; Chan et al., 2009).

Die darauffolgende Penetration des Virus in die Zelle erfolgt entweder über Membranfusion (Compton et al., 1992) oder über Rezeptor-vermittelte Endozytose (Bodaghi et al., 1999; Sinzger et al., 2008a). Für die Infektion von Endothel- bzw. Epithelzellen ist der pentamere Komplex aus den viralen Proteinen gH, gL, UL128, UL130 und UL131A essentiell (Hahn et al., 2004; Gerna et al., 2005; Wang et al., 2005a; Adler et al., 2006). Die Aufnahme in diese Zellen erfolgt mit hoher Wahrscheinlichkeit über Rezeptor-vermittelte Endozytose (Ryckman et al., 2006). Anschließend kommt es zur Freisetzung und Mikrotubuli-vermittelter Translokation des Nukleokapsids zum Zellkern der Wirtszelle. Dort bindet es an den Kernporenkomplex und setzt die virale DNA in das Nukleoplasma frei (Sodeik et al., 1997; Ojala et al., 2000; Ogawa-Goto et al., 2003; Kalejta, 2008a).

Die virale Genexpression verläuft während einer akuten Infektion in einer kaskadenartig regulierten Weise und wird in eine sehr frühe (IE; *Immediate Early*), eine frühe (E; *Early*) und eine späte (L; *Late*) Phase unterteilt (Honest et al., 1974; Emery et al., 1990; Mocarski et al., 2013). Die IE-Phase beginnt unmittelbar nach Eintritt der viralen DNA in den Zellkern mit der Transkription der *Immediate-Early* Gene. Hierzu zählen die als IE1- und IE2- bezeichneten *Major Immediate Early* (MIE)-Gene (Stenberg et al., 1984; Stenberg, 1996; Isomura et al., 2003; Meier et al., 2013). Die E-Phase der viralen Genexpression wird durch die IE-Proteine initiiert (Keil et al., 1984; Bühler et al., 1990) und beinhaltet die Transkription von Genen, die für die Replikation viraler DNA essentiell

sind (Pellet et al., 2007). Infolge viraler DNA-Synthese geht die Infektion in die L-Phase über, in der hauptsächlich Strukturproteine synthetisiert werden (Mocarski et al., 2013).

Die Morphogenese der Virionen beginnt im Zellkern. Zunächst werden Kapsidproteine zu Nukleokapsiden zusammengesetzt und in ihnen neusynthetisierte DNA verpackt. Eine produktive Interaktion dieser Nukleokapside mit dem *nuclear envelopment complex* (NEC), der hauptsächlich aus den viralen Proteinen pUL53 und pUL50 besteht, sowie einer Interaktion mit der Proteinkinase C initiiert die Ausschleusung der Kapside durch die innere Kernmembran in den perinukleären Raum. In diesem erhalten die Nukleokapside eine erste Membranhülle. Zudem werden hier bereits diverse Tegumentproteine und Glykoproteine mit dem Nukleokapsid assoziiert (Eickmann et al., 2006; Colberg Poley et al., 2013; Gibson et al., 2013; Mocarski et al., 2013). Durch anschließende Fusion der unreifen Partikel mit der äußeren Kernmembran wird die primäre Hülle abgestoßen. Nicht umhüllte Partikel treten daraufhin in das Zytoplasma ein (Mettenleiter, 2006; Britt, 2007; Mettenleiter et al., 2009; Johnson et al., 2011; Gibson et al., 2013).

Die Reifung des Teguments erfolgt durch Anlagerung viraler Proteine im Zytoplasma bzw. im sogenannten *viral Assembly Compartment* (vAC) (Sanchez et al., 2000a, b). Der vAC besteht aus zylindrischen Strukturen, die aus dem Trans-Golgi-Netzwerk, dem endoplasmatischen Retikulum (ER), dem *endoplasmic reticulum-golgi intermediate compartment* (ERGIC) sowie aus endosomalen Kompartimenten zusammengesetzt sind. Nukleokapside werden zudem am vAC mit einer doppelten Hüllmembran umgeben und anschließend in zytoplasmatischen Vesikeln zur Plasmamembran transportiert (Tooze et al., 1993; Fraile-Ramos et al., 2001; Colberg Poley et al., 2013). Daraufhin fusioniert die äußere Hüllmembran der Virionen mit der Zellmembran der Wirtszelle, worauf reife Viruspartikel in den extrazellulären Raum freigesetzt werden (Eickmann et al., 2006; Mettenleiter, 2006). Der Prozess des *final envelopments* sowie der Ausbildung des vAC ist von dem viralen Protein pUL71 abhängig (Womack et al., 2010; Schauflinger et al., 2011; Meissner et al., 2012). Neben den infektiösen Virionen werden zudem *non-infectious enveloped particles* (NIEPs) und *Dense Bodies* (DBs) freigesetzt. NIEPs besitzen einen ähnlichen Aufbau wie Virionen, ihnen fehlt jedoch die virale DNA im Nukleokapsid. DBs wiederum sind wesentlich größer und heterogener als Virionen (ca. 250-600 nm) und bestehen hauptsächlich aus Tegumentproteinen (Gibson, 2008). Sie enthalten weder ein Nukleokapsid noch virale DNA, weshalb sie wie NIEPs nicht infektiös sind. Die Tegument- und Hüllstrukturen von NIEPs, Virionen und DBs enthalten die gleichen viralen Proteine, wenngleich die jeweilige stöchiometrische Zusammensetzung der Proteine, insbesondere bei DBs, unterschiedlich ist (Irmiere et al., 1983; Varnum et al., 2004; Reyda et al., 2014a, b; Büscher et al., 2015).

1.1.2 Klinische Relevanz

HCMV ist ein weit verbreiteter, viraler Krankheitserreger. Die Prävalenz der Infektion ist dabei von sozio-ökonomischen Faktoren abhängig (Ahmed et al., 2006; Staras et al., 2006; Zhao et al., 2009; Correa et al., 2010; Lübeck et al., 2010; Furui et al., 2013). Während die Durchseuchungsrate in Mitteleuropa und Nordamerika bei ca. 40-60% der Gesamtbevölkerung liegt, findet sich in Entwicklungsländern aufgrund des geringen Hygienestandards eine nahezu 100%ige Durchseuchungsrate (Cannon et al., 2013; Mocarski et al., 2013). Die Übertragung von HCMV kann horizontal oder vertikal erfolgen. Horizontal wird HCMV vorwiegend durch direkten Körperkontakt über Speichel, Urin, Tränenflüssigkeit, Blut, Genitalsekret oder über die Muttermilch übertragen (Pass, 1985; Boppana et al., 2013; Mocarski et al., 2013). Zudem ist die Transmission über Bluttransfusionen oder Organtransplantationen möglich (Mocarski et al., 2013). Die vertikale Übertragung erfolgt prä- oder perinatal (Bhide et al., 2008; Ho, 2008; Bonalumi et al., 2011; Mocarski et al., 2013). Die Gefahr der intrauterinen Transmission besteht nicht nur während einer Primärinfektion oder Reaktivierung der HCMV-Infektion innerhalb der Schwangerschaft. Zu einer Übertragung kann es auch bei einer Superinfektion der seropositiven Mutter mit einem weiteren HCMV-Stamm kommen (Boppana et al., 2001; Ross et al., 2006; Kenneson et al., 2007; Yamamoto et al., 2010).

Bei immunkompetenten Individuen verläuft eine Primärinfektion mit HCMV meist asymptomatisch, da die Virusausbreitung durch das Immunsystem sehr effizient kontrolliert wird. Klinisch relevante HCMV-Infektionen finden sich dagegen vorwiegend bei Patienten mit eingeschränkter oder unreifer Immunabwehr. Hierzu zählen HIV- oder Krebspatienten sowie Empfänger von soliden Organen oder hämatopoetischen Stammzellen (Dowling et al., 1976; Neiman et al., 1977; Britt, 2008; Avery, 2013; Boppana et al., 2013; Emery et al., 2013; Seo et al., 2013).

Insbesondere HCMV-seronegative Transplantatempfänger, die ein Organ eines seropositiven Spenders erhalten, sind hochgradig gefährdet an einer schweren Infektion zu erkranken (Limaye et al., 2006; Ljungman et al., 2010; Boppana et al., 2013). Als Folgen einer HCMV-Infektion bei diesen Patienten werden am Häufigsten Pneumonie, Kolitis, Gastroenteritis sowie Etablierung einer Retinitis oder Hepatitis beobachtet (Reinke et al., 1999; Mocarski et al., 2013). Zudem ist die Infektion bei Transplantatempfängern häufig mit einer Abstoßungsreaktion verbunden (Ljungman et al., 2002; Boppana et al., 2013).

Die HCMV-Infektion ist darüber hinaus die zahlenmäßig häufigste, kongenitale Virusinfektion. Aufgrund der noch unvollständigen Ausreifung des Immunsystems kann es bei fetaler Infektion oder bei Infektionen des Neugeborenen zu schweren Verlaufsformen kommen. Abhängig von den sozio-ökonomischen Gegebenheiten liegen die

Infektionsraten bei 0,05% bis 1% (Kenneson et al., 2007; Britt, 2015). 0,5% dieser Neugeborenen sterben an der Infektion, 17-20% der überlebenden Kinder entwickeln langanhaltende Folgen. Beispiele hierfür sind Gehörverlust, Sehschwäche und geistige Retardierung (Pass et al., 2006; Dollard et al., 2007). Eine HCMV-spezifische Immunität schützt dabei nicht vor transplazentarer Übertragung, denn 1% der Föten seropositiver Mütter werden nach viraler Reaktivierung oder Superinfektion der Mutter mit HCMV infiziert (Cannon et al., 2005).

Eine Behandlung der akuten Infektion erfolgt derzeit durch Gabe von Virostatika wie beispielsweise Ganciclovir. Sie interferieren mit der viralen DNA-Polymerase und inhibieren dadurch die virale Replikation (Michel et al., 2013; Seo et al., 2013). Aufgrund ihrer hohen Toxizität sowie der zunehmenden antiviralen Resistenzen ist die Entwicklung alternativer Medikamente bzw. eines Impfstoffes gegen HCMV unabdingbar (Rosen et al., 1997; Steininger, 2007; Kaul et al., 2011; Michel et al., 2013; Schubert et al., 2013; Chemaly et al., 2014; Stoelben et al., 2014), insbesondere weil diese Medikamente keine Prävention einer kongenitalen HCMV-Infektion leisten (Ornoy et al., 2006).

1.2 Impfstoffentwicklung

1.2.1 Klinische Relevanz einer Vakzine gegen HCMV

Eine Impfung zur Prävention der kongenitalen HCMV-Infektion ist von hoher klinischer Relevanz. Ebenso könnte die Verfügbarkeit einer HCMV-Vakzine helfen, die Komplikationen nach Organ- oder Stammzelltransplantation besser zu kontrollieren. Schließlich wird eine ätiopathogenetische Rolle von HCMV bei der Entstehung von Arteriosklerose (Horvath et al., 2000) und Glioblastomen diskutiert (Soroceanu et al., 2011a, b; Rahbar et al., 2013). Auch hier wäre unter Umständen der Einsatz einer HCMV-Vakzine denkbar.

Die Entwicklung eines HCMV-Impfstoffs ist nicht nur aus medizinischer, sondern auch aus ökonomischer Sicht dringlich. So geht man zum Beispiel in den USA von vermeidbaren, wirtschaftlichen Kosten in Höhe von 1,86 Milliarden Dollar pro Jahr aus (Dobbins et al., 1992; Manicklal et al., 2013), die durch die medizinische und schulische Betreuung kongenital infizierter Kinder entstehen. Das *Institute of Medicine* der *National Academy of Science USA* hat daher der Entwicklung einer HCMV-Vakzine höchste Priorität zugeordnet (Griffiths, 2009).

Ein Impfstoff muss die Eigenschaft besitzen, neben der humoralen auch die zelluläre Immunantwort zu stimulieren. Neutralisierende Antikörper verhindern nach aktueller

Lehrmeinung die diaplazentare Übertragung von HCMV (Maidji et al., 2010). Der neutralisierende Titer sowie die Avidität von IgG-Antikörpern gegenüber CMV-Antigenen korreliert dabei invers zur Transmission von HCMV über die Plazenta (Boppana et al., 2001; Nigro et al., 2005). Die Infektion selbst wird zwar nicht verhindert, der Schweregrad jedoch positiv beeinflusst (Bratcher et al., 1995; Adler et al., 2009; Schleiss, 2013).

Im Gegensatz zu neutralisierenden Antikörpern dient die zelluläre Immunantwort der Begrenzung der HCMV-Infektion (Gamadia et al., 2001; Kern et al., 2002; Harari et al., 2004; Sylwester et al., 2005; Slezak et al., 2007; Terrazzini et al., 2014). Das Verhältnis der CD8⁺ bzw. CD4⁺ T-Zellen, die gegen HCMV-Antigene gerichtet sind, ist außergewöhnlich hoch. Im Mittel sind etwa 10% der im peripheren Blut vorhandenen CD8⁺ bzw. CD4⁺ T-Zellen seropositiver Individuen HCMV spezifisch und in der Lage Effektorfunktionen auszuüben (Sylwester et al., 2005; Crough et al., 2009; Hansen et al., 2013). Es gibt Hinweise darauf, dass HCMV-spezifische T-Zellen diaplazentare Transmission begrenzen können (Lilleri et al., 2008). Ein eindeutiger Zusammenhang konnte bisher aber nicht gezeigt werden. Im Gegensatz hierzu ist es allgemein anerkannt, dass CD8⁺ bzw. CD4⁺ T-Zellen die wesentlichen Effektoren zur Kontrolle der HCMV-Infektion nach Transplantation darstellen (Riddell et al., 1992; Riddell et al., 1994, 1995; Reusser et al., 1999; Einsele et al., 2002; Sester et al., 2002; Peggs et al., 2003; Cobbold et al., 2005; Radha et al., 2005; Sester et al., 2005).

1.2.2 Impfstoffkandidaten

1.2.2.1 Lebend attenuierte Viren

Die ersten Versuche zur Entwicklung einer HCMV-Vakzine beruhten auf attenuierten HCMV-Stämmen (Elek et al., 1974; Plotkin et al., 1975). Die in vielen klinischen Studien getestete Towne-Vakzine basiert auf einem HCMV-Isolat, welches durch Zellkulturpassagen in humanen Vorhautfibroblasten (HFF; *human foreskin fibroblasts*) attenuiert wurde (Plotkin et al., 1975; Plotkin et al., 1976; Plotkin, 1981). Sie war geeignet, sowohl humorale als auch zelluläre Immunantworten zu induzieren (Adler et al., 1998). Ein wirksamer Schutz vor mütterlicher Primärinfektion konnte jedoch nicht erreicht werden (Adler, 1995). In einem Versuch, die Immunogenität der Towne-Vakzine zu verbessern, wurden rekombinante Viren hergestellt, in denen ca. 25% des Towne-Genoms durch die entsprechenden Sequenzen des kliniknahen Isolates Toledo ausgetauscht wurden. Diese sogenannten Towne-Toledo-Chimäre erwiesen sich als verträglich, konnten die CMV-assoziierte Immunität jedoch nicht steigern (Heineman et al., 2006). Momentan werden die Chimäre-Vakzine in einer klinischen Phase-I-Studie getestet.

1.2.2.2 Totantigene und Vektorexpressionssysteme

Ein möglicher Ansatz für die Entwicklung einer HCMV-Vakzine ist die Applikation rekombinanter viraler Proteine bzw. viraler Peptide, die meist in Kombination mit einem Adjuvans verabreicht werden. Eine alternative Methode ist die Verabreichung von Expressionssystemen, bei denen die gewünschten Immunogene zunächst *in vivo* generiert werden müssen. Der Fokus bei der HCMV-Impfstoffentwicklung liegt dabei hauptsächlich auf den viralen Proteinen pp65, IE1 bzw. dem Glykoprotein B (gB). Die viralen Proteine pp65 und IE1 induzieren die zelluläre Immunantwort, während durch gB die humorale Immunantwort stimuliert wird. Ein von Sanofi entwickelter Impfstoffkandidat beruht zum Beispiel auf einer löslichen Form des Membranproteins gB sowie dem Adjuvans MF59, einer Öl in Wasser-Emulsion (Frey et al., 1999). In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass durch Applikation der Vakzine das Auftreten primärer HCMV-Infektionen um 50% gesenkt werden kann (Pass, 2009). Die von gB/MF59-induzierte Immunität nimmt jedoch schnell ab (Lilja et al., 2012). Der Anteil an neutralisierenden Antikörpern, die eine Infektion von Epithelzellen verhindern, kann durch Präsentation von gB auf der Oberfläche von sogenannten Virus-ähnlichen Partikeln (*VLPs; virus-like particles*) gesteigert werden. Ob die durch VLPs-induzierte Immunität jedoch langanhaltend ist, wurde bisher nicht untersucht (Kirchmeier et al., 2014).

Weitere Impfstoffkandidaten sind die von Vical entwickelten Impfstoffe TransVax und CyMVectin. Diese Impfstoffe enthalten Plasmid-DNA, welche für die viralen Proteine pp65 und gB kodieren. CyMVectin ist zudem das Adjuvans Vaxfectin zugesetzt, das geeignet ist die humorale sowie die zelluläre Immunantwort zu stimulieren. In einer klinischen Studie konnte zudem gezeigt werden, dass TransVax die HCMV-Virämie nach Stammzelltransplantation verringert (Kharfan-Dabaja et al., 2012). AVX601, ein Alphavirus-Replicon Impfstoff, welcher gB und ein pp65/IE1-Fusionsprotein exprimiert, ist ein weiterer Kandidat (Reap et al., 2007). Dieser wurde bisher in einer Phase-I-klinischen Studie getestet.

Neuere Studien konnten zeigen, dass die Mehrheit der Epithelzell-spezifischen, neutralisierenden Antikörper gegen Epitope des pentameren Komplexes gH/gL/pUL128-131A gerichtet ist. Daher fokussiert sich die Entwicklung möglicher neuer Impfstoffe auf den Einsatz dieses Komplexes. Verschiedene Ansätze werden zurzeit untersucht, die zum Beispiel die Nutzung einfacher Peptide bzw. Untereinheiten des Komplexes, rekombinante Multieinheiten wie gH/gL sowie Multieinheiten des ganzen pentameren Komplexes beinhalten (Freed et al., 2013; Kabanova et al., 2014; Wussow et al., 2014; Hofmann et al., 2015). Bei Immunisierung von Kaninchen mit Peptiden der viralen Proteine UL130 und UL131A konnte gezeigt werden, dass die induzierte, neutral-

isierende Antikörperantwort eine Infektion von Epithelzellen verhinderte. Zudem übertraf der neutralisierende Antikörpertiter den der meisten seropositiven Humanseren (Saccoccio et al., 2011).

1.2.2.3 Subvirale Partikel – *Dense Bodies*

Dense Bodies (DBs) sind nicht-infektiöse subvirale Partikel, die in großen Mengen von infizierten Fibroblasten freigesetzt werden. Anschließend können sie aus Zellkulturüberstand mittels eines positiven Dichte- /negativen Viskositäts-Gradienten-Systems getrennt und aufgereinigt werden (Craighead et al., 1972; Irmiere et al., 1983; Roby et al., 1986; Topilko et al., 1994). Sie besitzen weder ein Kapsid noch virale DNA, weshalb eine Replikation nicht möglich ist. Zudem bestehen diese umhüllten Partikel hauptsächlich aus dem immundominanten Tegumentprotein pp65 (UL83), welches 60% der relativen Proteinmasse darstellt (Varnum et al., 2004). Der Umstand, dass DBs auf ähnliche Weise wie Virionen in die Wirtszelle aufgenommen werden, legt den Schluss nahe, dass die auf der Oberfläche von DBs vorhandenen Glykoproteine in ihrer funktionellen Konformation vorliegen (Topilko et al., 1994). DBs sind *in vitro* in der Lage, die Ausreifung und Aktivierung dendritischer Zellen zu induzieren (Sauer et al., 2013). Bei subkutaner oder intraperitonealer Injektion von Mäusen kann zudem eine signifikante Menge an neutralisierenden Antikörpern gegen HCMV nachgewiesen werden. Die Neutralisationsaktivität dieser Antikörper ist breiter als die durch Immunisierung mit gB-Impfstoffen induzierte, da sie in der Lage ist sowohl die Infektion von Fibroblasten wie auch die von Endothel- und Epithelzellen zu verhindern (Cayatte et al., 2013). Aufgrund ihrer Immunogenität stellen DBs eine vielversprechende Basis für die Entwicklung eines HCMV-Impfstoffes dar (Pepperl et al., 2000; Pepperl-Klindworth et al., 2002; Mersseman et al., 2008b).

1.2.3 Herstellung von Impfstoffen

Zur Bereitstellung von Lebendimpfstoffen müssen die betreffenden Virusstämme unter kontrollierten Bedingungen amplifiziert werden. Seit den 1930 Jahren werden Viren in embryonierten Hühnereiern vermehrt (Goodpasture et al., 1931). Diese Methode findet noch heute Verwendung und wird vor allem bei der Herstellung von Influenzaimpfstoffen eingesetzt (Gerdil, 2003). Neben der Problematik eines immensen Bedarfs an Hühnereiern, dem zeitaufwändigen Prozess der Virusvermehrung mit variierenden Ausbeuten sowie den hohen Herstellungskosten, birgt die Methode zudem das Risiko, durch Verunreinigungen des Impfstoffes mit Eiproteinen allergische Reaktionen auszulösen (Robertson et al., 1995; Audsley et al., 2008; Fedson, 2008; Montomoli et al., 2012). Die Zell-basierte Produktionstechnologie andererseits ermöglicht Herstellern,

höhere Ausbeuten der betreffenden Vakzine in kürzerer Zeit anzubieten. Die in Zellkultur gewonnenen Viren bieten zudem den Vorteil, eine höhere antigene Ähnlichkeit mit dem zirkulierenden Stamm aufzuweisen (Robertson et al., 1995), während die aus Eiern hergestellten Viren zum Teil modifiziert vorliegen (Robertson et al., 1987; Hardy et al., 1995). Eine Zell-basierte Virusvermehrung wurde zum ersten Mal 1954 von Salk et al. am Beispiel der Herstellung einer Poliomyelitis-Vakzine auf Affennierenzellen beschrieben (Salk et al., 1954). Primäre embryonale Hühnerfibroblasten (CEF; *chicken embryo fibroblasts*) sind noch heute die mit Abstand am häufigsten eingesetzten primären Zellen, die bei der Herstellung von Impfstoffen gegen zum Beispiel Masern und Mumps Verwendung finden (Katz et al., 1958; Beck et al., 1989; Escoffier et al., 1999; Hauser et al., 2014). Die Nutzung primärer Zellen birgt jedoch Probleme. Aufgrund ihrer eingeschränkten Fähigkeit zur Selbsterneuerung, ist eine wiederholte Präparation dieser Zellen unumgänglich. Dieser Umstand geht mit einem erhöhten Kontaminationsrisiko der Zellkultur einher, weshalb sicherere, günstigere und effizientere Zellsubstrate benötigt werden. Diploide Zelllinien, wie die humanen embryonalen Lungenfibroblasten MRC-5 (*Medical Research Council-5*) (Jacobs et al., 1970) und WI-38 (*Wistar-Institute 38*) (Hayflick, 1965), sind Subkulturen von primären Zellen und weisen einen Karyotyp auf, der zu mindestens 85% mit dem der Primärkultur identisch ist (Mayr et al., 2006). Diese Zelllinien weisen jedoch eine limitierte Kapazität zur Vermehrung auf (Passage 10-50), weshalb sie für die meist lang andauernden Entwicklungsprozesse neuer Vakzine ungeeignet sind. Immortalisierte Zelllinien sind aufgrund einer unlimitierten Vermehrungskapazität von dieser Problematik ausgeschlossen.

1.3 Immortalisierte Zelllinien

Die Auswahl einer Zelllinie für die Produktion eines Impfstoffes hängt von mehreren Parametern ab. Neben der Suszeptibilität und Permissivität der Zellen gegenüber dem viralen Pathogen sind die Ausbeuten, ethische Aspekte, die Tumorigenität der Zelllinie, Herstellungskosten sowie die Ausschließung einer Kontamination des Produktes mit Fremdpathogenen zu berücksichtigen. Im Gegensatz zu primären Zellen bietet die Verwendung von immortalisierten Zelllinien Vorteile. Solche Zellen sind in der Regel unlimitiert vermehrungsfähig und genetisch einheitlich. Aufgrund ihrer gegenüber primären Zellen erhöhten Teilungsfrequenz können in kürzerer Zeit größere Mengen zur Produktion bereitgestellt werden. In einzelnen Fällen lassen sich immortalisierte Zelllinien in Suspension kultivieren. Dies vereinfacht die Passage, zudem werden Zeit und Kosten eingespart. Für die Herstellung von Impfstoffen eignen sich daher besonders immortalisierte Suspensionszellkulturen (Hauser et al., 2014).

1.3.1 Spontan immortalisierte Zelllinien

In Zellkulturen kann es durch die Wahl der Zellkulturbedingungen, die es primären Zellen erlaubt den Prozess der replikativen Seneszenz zu überleben, zu spontanen Mutationen kommen. Die korrekte Kombination von Mutationen in Onkogenen oder Genen von Tumorsuppressorproteinen kann dabei in seltenen Fällen zu einer spontanen Immortalisierung der primären Zellen führen. Einige Beispiele für solche Zelllinien sind die MDCK-, die Vero-, die BHK21- und die CHO-Zelllinie.

1.3.1.1 Madin-Darby Hundenierenzellen (MDCK; Madin-Darby *Canine Kidney Cells*)

Die hyperdiploide MDCK-Zelllinie wurde aus der Niere eines gesunden, weiblichen Cocker Spaniels im September 1958 von S.H. Madin und N.B. Darby gewonnen (Madin et al., 1958; Gauth et al., 1966). Diese Zellen können beispielsweise mit humanen Coxsackieviren B3, B4 und B5, dem vesikulären Stomatitis-Virus (VSV) oder mit Influenza-Viren infiziert werden. Diese Zelllinie ist für die Herstellung von Influenza-Impfstoffen zugelassen. Auf dem Markt erhältlich ist der Impfstoff Optaflu® (Novartis) (Doroshenko et al., 2009). Mittlerweile existiert zudem eine Variante dieser Zelllinie, die unter Serum-freien Bedingungen in Suspension kultiviert werden kann (Chu et al., 2009; Lohr et al., 2010; van Wielink et al., 2011). Abhängig von dem verwendeten Subklon gibt es Berichte über eine sowohl hohe als auch niedrige Tumorigenität dieser Zelllinie (Onions et al., 2010; Gregersen et al., 2011). Aufgrund seiner strikten Spezifität eignet sich diese Produktionszelllinie jedoch nicht für die Vermehrung von HCMV.

1.3.1.2 Vero-Zellen

Die hypodiploide, kontinuierliche Vero-Zelllinie wurde 1962 von Y. Yasumura und Y. Kawakita aus dem Nierenepithel einer äthiopischen Grünmeerkatze (*Chlorocebus aethiops*) gewonnen (Yasumura et al., 1963). Vero-Zellen sind suszeptibel gegenüber einer Reihe verschiedener Viren, darunter das Masern-Virus, das Mumps-Virus, die Influenza-Viren A und B, die humanen Polio-Viren 1, 2 und 3 sowie diverse humane Adenoviren.

Die Zelllinie ist für die Produktion verschiedener Impfstoffe zugelassen (Kistner et al., 1998; Brühl et al., 2000; Halperin et al., 2002). Darunter sind Impfstoffe gegen Tollwut (VERORAB®, Abhayrab®) (Sampath et al., 2005; Toovey, 2007), Influenza (Celvapan®, Preflucel®) (Lagler et al., 2011; Chan et al., 2012) und Polioviren (IMOVAX Polio®, Adacel®) (Vergara et al., 2005; Halperin, 2006). Den Vero-Zellen eigen ist der Verlust zur Produktion von Interferonen. Sie besitzen zwar Interferon-Rezeptoren, sind aber nicht zur Sekretion der Interferone α und β befähigt (Desmyter et al., 1968). Eine erhöhte

Tumorigenität bei Passagen über p150 ist belegt (Sheets, 2000; Manohar et al., 2008), weshalb für die Vakzine-Herstellung nur geringere Passagen verwendet werden dürfen. Aufgrund der erhöhten Nachfrage verringern sich die Bestände „jüngerer“ Zellen jedoch stetig. Auch in diesen Zellen lässt sich HCMV nicht vermehren.

1.3.1.3 Babyhamsternierenfibroblasten (BHK-21 (C-13); *Baby Hamster Kidney*)

Die pseudodiploide, adhärente BHK-21 (C-13) Zelllinie wurde 1961 von I. A. Macpherson und M. G. P. Stoker aus fünf Babyhamsternieren syrischer Goldhamster (*Mesocricetus auratus*) isoliert (Macpherson et al., 1962; Stoker et al., 1964). BHK-21 sind permissiv gegenüber einem weiten Spektrum an Viren, darunter zum Beispiel das humane Adenovirus Typ 25, das Reovirus 3, das VSV sowie das humane Poliovirus 2. Außerdem wird diese Zelllinie für die Forschung verschiedener Impfstoffkandidaten eingesetzt (Albarino et al., 1997; Polo et al., 1999), doch bis heute ist kein lizenzierter, auf dieser Zelllinie basierender, Impfstoff erhältlich. Ein Grund hierfür dürfte die hohe Tumorigenität dieser Zelllinie sein, die bei hohen Passagen aufgrund spontan auftretender Transformationen sogar noch verstärkt wird (Stoker, 1962; Macpherson, 1963; Jarrett et al., 1968).

1.3.1.4 Eierstockzellen des chinesischen Hamsters (CHO; *Chinese Hamster Ovary*)

Die hypodiploide, adhärente CHO-Zelllinie wurde von T. T. Puck 1957 als Subklon einer Primärkultur Epithel-ähnlicher Eierstockzellen erhalten, welche wiederum im Zuge einer Biopsie eines chinesischen Hamsters (*Cricetulus griseus*) isoliert wurden (Puck et al., 1958; Tjio et al., 1958). Im Gegensatz zu der BHK-21 Zelllinie sind CHO-Zellen sehr widerstandsfähig gegenüber produktiven Infektionen mit einer Reihe verschiedener Viren (Marsh et al., 1997; Berting et al., 2010). Daher finden CHO-Zellen auch keine Verwendung als Substrat für die Replikation von Impfstoffviren. Trotz ihrer Fähigkeit in Nacktmäusen Tumore zu induzieren sowie Partikel von endogenen Proviren freizusetzen, sind CHO-Zellen eine der am häufigsten verwendeten Zelllinien bei der Produktion rekombinanter Proteine und Antikörper (Jayapal et al., 2007; Hacker et al., 2009). Die von Novartis entwickelte und zurzeit in klinischen Studien getestete gB/MF59 Vakzine beruht auf dem löslichen, rekombinanten Oberflächenprotein gB, welches in CHO-Zellen produziert wird (Pass et al., 1999; Zhang et al., 2006). Aufgrund der strikten Spezifität von HCMV eignet sich diese Zelllinie jedoch nicht für die Produktion von Virionen oder *Dense Bodies*.

1.3.2 Designer-Zelllinien

Das Hauptproblem einer spontan immortalisierten Zelllinie ist der zum Teil unbekannt Transformationsfaktor und die mögliche Übertragung dieses Faktors auf den Rezipienten im Zuge einer Impfung. Mit Hilfe präziser Manipulation einer Zelle kann die Aktivierung multipler und nicht-charakterisierter Onkogene ausgeschlossen werden, wodurch die Onkogenität einer Zelllinie besser beschrieben werden kann. Die unter dem Begriff Designer-Zelllinien bekannten manipulierten Zellen bieten den Vorteil, dass ihre Herkunft eindeutig dokumentiert und als sicher eingestuft ist sowie sämtliche Arbeitsschritte und Passagen aufgezeichnet sind (Genzel, 2015). Zudem sind diese Zellen zum Wachstum in Suspension unter Serum-freien Bedingungen befähigt, wodurch unerwünschte Kontaminationen mit Fremdpathogenen ausgeschlossen und Kosten gespart werden können. Der Gebrauch von definiertem Serum-freiem Medium bietet zudem den Vorteil, dass die Herstellungsprozesse besser reproduzierbar sind und die Zusammensetzung solcher Medien gezielt in Richtung Ausbeutensteigerung verändert werden können. Beispiele für derzeit verfügbare Designer-Zelllinien sind die humane retinale PER.C6-Zelllinie, die aus der Retina einer Ente gewonnene Zelllinie AGE1.CR, die aus embryonalen Stammzellen einer Ente generierte Zelllinie EB66 sowie die humane, amniozytäre Zelllinie CAP. Diese Zellsubstrate werden derzeit auf ihre Fähigkeit getestet diverse Viren zu vermehren, was die Produktion neuer Impfstoffkandidaten ermöglichen könnte. Gleichzeitig wird getestet, ob diese Zelllinien eine effizientere Produktion im Vergleich zu älteren Zellsubstraten zulassen. Aufgrund der im Vorfeld erwähnten strikten Speziespezifität des humanen Cytomegalovirus wird im Folgenden nur auf die humanen Zelllinien PER.C6 und CAP eingegangen.

1.3.2.1 PER.C6

Die der PER.C6 Zelllinie stark ähnelnden HEK293 Zellen (Graham et al., 1977) sind ein sehr effizientes Produktionssystem für E1-deletierte Adenoviren. Sie besitzen jedoch Homologien zu Sequenzen dieser adenoviralen Vektoren. Durch homologe Rekombination kann es zur Bildung replikationskompetenter Adenoviren (RCA; *replication-competent adenoviruses*) kommen (Spector, 1983; Louis et al., 1997), die wiederum ein signifikantes Risiko für Vektorempfänger darstellen. Um diesen Umstand zu vermeiden, wurde bei der Entwicklung der PER.C6 Zelllinie die immortalisierende E1A/E1B-Kombination unter Kontrolle heterologer Promotoren gebracht. Dadurch wurde das Risiko der Bildung von RCAs durch fehlende Homologien zu den viralen Sequenzen signifikant reduziert (Farson et al., 2006). Die PER.C6 Zelllinie beruht auf humanen embryonalen Retinoblasten, die 1985 aus einem 18 Wochen alten, abgetriebenen Fötus

isoliert wurden (Gallimore et al., 1986). Mittels Transformation der Primärkultur mit den adenoviralen Genen E1A und E1B wurde sowohl die 911 Zelllinie (Fallaux et al., 1996), als auch die PER.C6 Zelllinie (Fallaux et al., 1998) generiert.

Neben der Produktion E1-deletierter, adenoviraler Vektoren (Yallop, 2005; Lemckert et al., 2006; Vellinga et al., 2014) und diverser pharmazeutisch genutzter Proteine und Antikörper (Durocher et al., 2009; Kuczewski et al., 2011) findet diese Zelllinie auch für die effiziente Produktion einer Reihe von Viren Verwendung. Darunter fallen das Influenza-Virus (Genzel et al., 2009; Barrett et al., 2010), das Poliovirus (Sanders et al., 2013), das West-Nil-Virus und das Ebola Virus (Samina et al., 2007). PER.C6 sind bei subkutaner Injektion in immunodefiziente Nacktmäuse geeignet, Tumore zu induzieren. Ledwith et al. konnten jedoch zeigen, dass aus diesen Zellen isolierte DNA keine tumorigenen Eigenschaften aufweist, weshalb sich diese Zelllinie für die Impfstoffentwicklung eignet (Ledwith et al., 2006). Auf PER.C6 hergestellte Impfstoffkandidaten, zum Beispiel gegen Influenza oder das West-Nil-Virus, werden derzeit entwickelt. Die PER.C6 Zelllinie ist humanen Ursprungs und kann unter Bedingungen guter Herstellungspraxis (GMP; *good manufacturing practice*) in Suspension unter Serum-freien Bedingungen kultiviert werden. PER.C6 würden daher ein geeignetes Zellsubstrat für die Produktion einer HCMV-Vakzine darstellen. Bis zum heutigen Zeitpunkt stehen jedoch keine Informationen zu Verfügung, die eine Permissivität der PER.C6 Zelllinie gegenüber HCMV belegen.

1.3.2.2 Cevec's Amniozyten-basierte Produktionszelllinie (CAP; *Cevec's amniocyte production*)

CAP-Zellen sind humane Amniozyten, die im Rahmen einer routinemäßig durchgeführten Amniozentese aus Fruchtwasser gewonnen wurden. Im Gegensatz zu HEK293 und PER.C6, die aus Abortmaterial stammen, ist der Einsatz von humanen Amniozyten für Produktionszwecke ethisch unbedenklich. Wie bei der PER.C6 Zelllinie wurde die Primärkultur der CAP-Zellen mit adenoviralen Funktionen transformiert (E1A, E1B und pIX Funktionen). Die transformierende Expressionskassette wurde dabei so gewählt, dass auch hier keine homologe Rekombination mit adenoviralen Expressionsvektoren auftreten kann und die Bildung von RCA somit praktisch ausgeschlossen ist (Schiedner et al., 2000). Der Zelltyp, aus dem die immortalisierte CAP-Zelle hervorgegangen ist, ist noch nicht vollständig untersucht, jedoch scheinen CAP-Zellen im Gegensatz zu anderen Säugetierzelllinien weniger differenziert zu sein (Fischer et al., 2012). CAP-Zellen sind für eine effiziente und reproduzierbare Expression von Proteinen einsetzbar (Schiedner et al., 2008; Fischer et al., 2012). Zudem stellen sie ein Wirtszellsubstrat für die Vermehrung von Influenza-Viren (Genzel et al., 2013;

Genzel et al., 2014; Genzel, 2015) sowie für das respiratorische Syncytial-Virus (RSV) dar (Vlecken et al., 2013). Infektionen mit den Polio-Viren 1-3 zeigen annehmbare Virustiter (Vlecken et al., 2013).

CAP-Zellen können adhärent unter Zusatz von fötalem Kälberserum kultiviert werden. Gleichzeitig steht aber auch die Möglichkeit ihrer Anzucht in Suspension unter Serum-freien Bedingungen und in chemisch definierten Medien zur Verfügung (Schiedner et al., 2008). Es liegt eine ausreichende Dokumentation dieser Zelllinie vor, die das Arbeiten unter GMP-Bedingungen möglich macht. Somit stellt sie ein geeignetes Zellsubstrat für die Impfstoffproduktion dar. Über die Suszeptibilität der CAP-Zelllinie gegenüber HCMV war zum Beginn dieser Arbeit nichts bekannt.

1.4 Zielsetzung

Die Entwicklung einer Impfung gegen HCMV hat aufgrund der klinischen Relevanz des Erregers hohe Priorität. Seit geraumer Zeit fokussiert sich die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Bodo Plachter in Mainz auf die Verwendung subviraler *Dense Bodies* als Grundlage für die Entwicklung eines HCMV-Impfstoffs. Die Herstellung derartiger subviraler Partikel war zu Beginn der Arbeit nach Anzucht von HCMV in primären Fibroblasten gelungen. Jedoch ist die Verwendung dieser Zellen für den Herstellungsprozess aus verschiedenen Gründen problematisch.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu prüfen, ob CAP-Zellen gegenüber einer Infektion mit HCMV suszeptibel sind und sich somit für die Entwicklung eines DBs-Herstellungsprozesses eignen. Der Ablauf der HCMV Infektion in CAP-Zellen sollte mit der Infektion von permissiven Fibroblasten und nicht-permissiven HEK293 verglichen werden.

Entscheidende Vorgänge im Lebenszyklus von HCMV, wie Adsorption/Penetration, Genexpression, virale Genomreplikation und Partikelmorphogenese sollten molekular analysiert und Unterschiede herausgearbeitet werden. Auf der Grundlage der daraus resultierenden Erkenntnisse sollte geprüft werden, inwiefern sich derartige Unterschiede auf die Produktivität der CAP-Zellen gegenüber HCMV auswirkten. Hierauf aufbauend sollten Lösungsstrategien entwickelt werden, um die HCMV-Vermehrung und DBs-Synthese in CAP-Zellen zu optimieren.

2. Material und Methoden

2.1 Allgemeine Laborgeräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Analysewaage	BP61	Sartorius AG (Göttingen)
Brutschrank	B12	Heraeus (Hanau)
Bunsenbrenner	Fireboy eco	INTEGRA Biosciences (Zizers, Schweiz)
CO ₂ -Inkubator	Forma Steri-Cult	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
	Steri-Cult Incubator 200	Forma Scientific Inc. (Marietta, OH, USA)
	Steri-Cult Incubator 3035	Forma Scientific Inc. (Marietta, OH, USA)
Durchflusszytometer	Cytomics FC500	Beckman Coulter, Inc. (Brea, CA, USA)
Elektroblot-Apparatur	PerfectBlue 'Semi-Dry' Blotter Sedec M	VWR International GmbH (Erlangen)
Elektronenmikroskop	Tecnai 12 Bio-Twin TEM	FEI Company (Hillsboro, OR, USA)
Flockeneisbereiter	AF100	Scotsman Ice Systems (Mailand, Italien)
	AF103 Ice Flaker	Scotsman Ice Systems (Mailand, Italien)
Fluoreszenzlampe	HB0 50W/ACL1	Osram (München)
	HB0 103W/2	Osram (München)
Flüssigstickstofftank	RS Series	tec-lab Inh. Karl Weinhappel (Königstein/Ts.)
	XL-160	Taylor-Wharton (Minnetonka, MN, USA)
Folienschweißgerät	Polystar 583	Rische + Herfurth (Hamburg)
Gefrierschrank	88000 Series Forma	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Heizschüttler	Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg)

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Heizschüttler	Thermomixer compact	Eppendorf (Hamburg)
Infrarot-Scanner	Odyssey Infrared Imager CLx	LI-COR Biotechnology (Lincoln, NE, USA)
Kühlschränke	Premium	Liebherr Group (Kirchdorf)
	CNP 3913	Liebherr Group (Kirchdorf)
	GSS 3666, Öko Super	Liebherr Group (Kirchdorf)
Laborwaage	LP5200P	Sartorius AG (Göttingen)
Mehrkanalpipette, verstellbar	Research plus 30-300 µL	Eppendorf (Hamburg)
	Discovery 20-200 µL	Kinesis GmbH (Langenfeld)
	XLS+ 20-200 µL	Mettler-Toledo GmbH (Gießen)
Mikroskop	Axiovert 25	Zeiss (Jena)
	Axiophot	Zeiss (Jena)
	Leitz DM IRB	Leica (Wetzlar)
Mikroskop-Kamera	SPOT Flex Camera FX1520	SPOT Imaging Solutions (Burroughs, MI, USA)
Mikroskop-Schneider	Reichert Ultracut S	Leica (Wetzlar)
Mikrowelle	M1712N	Samsung Group (Daegu, South Korea)
Multistepper	HandyStep	BrandTech® Scientific Inc. (Essex, CT, USA)
pH-Meter	FE20-Five Easy pH	Mettler-Toledo GmbH (Gießen)
	Research Pro 50-1.000 µL	Eppendorf (Hamburg)
	Pipetboy II acu	INTEGRA Biosciences (Zizers, Schweiz)
real-time Cycler	ABI Prism 7500 real-time PCR System	Life Technologies GmbH (Darmstadt)
Schüttelinkubator	LSE Orbital Shaker Nr. 6781-NP	Corning Inc. (Corning, NY, USA)
Schüttler	HS501 digital	IKA Werke (Staufen)
Sterilbank	HeraSafe	Heraeus (Hanau)
Stromquelle	Electrophoresis Power Supply-EP6 600	Pharmacia Biotech (Freiburg)
TEM-Kamera	Megaview III	Olympus Corporation (Shinjuku, Tokyo, Japan)
Ultrazentrifuge	Optima L-90K (Rotoren SW41, SW32Ti)	Beckman Coulter, Inc. (Brea, CA, USA)
Vortex	MS1 und MS3 Minishaker	IKA Werke (Staufen)

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Wärmeschrank		Labotec Labortechnik Vertriebs GmbH (Wiesbaden)
Wasserbad mit Thermostat	WB7L1	Memmert (Schwabach)
Zählkammern	Neubauer bright-line Nr. 0640130	Paul Marienfeld GmbH + Co. KG (Lauda-Königshofen)
Zentrifugen	Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)
	Centrifuge 5417C	Eppendorf (Hamburg)
	Megafuge 2.0	Heraeus (Hanau)
	Tischzentrifuge 5417C	Eppendorf (Hamburg)
	Cytospin 4	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
	Labofuge 400R	Heraeus (Hanau)
	Mini Centrifuge C-1200	VWR International GmbH (Darmstadt)
	Multifuge 3L	Heraeus (Hanau)
	SPROUT-BC Micro- Centrifuge	Heathrow Scientific (Vernon Hills, IL, USA)
	Rotilabo-mini-Centrifuge	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Adapter für Multistepper	25 mL + 50 mL Nr. 147870370	neoLab Migge Laborbedarf- Vertriebs GmbH (Heidelberg)
	MBT-Dispenser-Tips; 0,5 mL Nr. 147870105	neoLab Migge Laborbedarf- Vertriebs GmbH (Heidelberg)
	Combitips plus; 2,5 mL Nr. E-6334	neoLab Migge Laborbedarf- Vertriebs GmbH (Heidelberg)
	MBT-Dispenser-Tips; 50 mL Nr. 147870165	neoLab Migge Laborbedarf- Vertriebs GmbH (Heidelberg)
Bis-TRIS-Gele	Bolt 10% Bis-TRIS Plus Gel; 10-Well Nr. BG00100BOX	Life Technologies GmbH (Darmstadt)
	Bolt 10% Bis-TRIS Plus Gel; 15-Well Nr. BG00105BOX	Life Technologies GmbH (Darmstadt)
	Bolt 4-12% Bis-TRIS Plus Gel; 10-Well Nr. BG04120BOX	Life Technologies GmbH (Darmstadt)

2.2 Verbrauchsmaterialien und Plastikware

Material	Bezeichnung	Hersteller
Deckelkette für qPCR	Deckelkette für 8er Streifen; PP; Natur; für qPCR; unsteril Nr. 373250	Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster)
Deckgläschen	Shandon Cytoslides® Doppelkreis; beschichtet; 76x26x1 mm Nr. 59910055	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
	BD BioCoat™ Cellware Poly-L-Lysine; 12 mm Coverslips Nr. 354085	Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA)
	Deckgläser Stärke 1; 12 mm Nr. CB00120RA1	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Durchflusszytometer- röhrchen	Röhrchen mit Rundboden; PS; 5 mL; unsteril Nr. 352008	Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA)
	Tube; 5 mL; PS; 12x75 mm; round bottom; clear Nr. 115101	Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster)
Einfrierboxen	Nalgene Cryo 1°C "Mr. Frosty"; Freezing Container Nr. 5100-0001	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
	Rotilabo-Cryoboxen; PP; 9x9 Nr. T435.1-T439.1	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
	Rotilabo-Cryoboxen; Karton; 9x9 Nr. P895.2	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Einfrierröhrchen	CryoPure; 2 mL; sterile; non-pyrogenic Nr. 72.379.992	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Einmalkanülen	BD Microlance 3; 18G; 1,2x40 mm; 1.5" Nr. 304622	Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA)
	BD Microlance 3; 23G; 0,6x30 mm; 1.25 Nr. 300700	Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA)
	Sterican; 26G; 0,45x25 mm; 1" Nr. 4657683	B. Braun AG (Melsungen)
Einmalspritzen	BD 10 mL Discardit II Syringe Nr. 301285	Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA)

Material	Bezeichnung	Hersteller
Einmalspritzen	Omnifix 10 mL; non-sterile Nr. 8502358	B. Braun AG (Melsungen)
	Injekt Solo Luer 2 mL Nr. 4606027V	B. Braun AG (Melsungen)
Filterpapier für Westernblot	Whatman Cellulose Chromatography Paper Roll Nr. 3030690	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Magnetrührstab	Rotilabo-magnetische Rührstäbchen; zylindrisch; 35x6 mm Nr. 1292.2	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
	Rotilabo-magnetische Rührstäbchen; zylindrisch; 8x50 mm Nr. 1482.2	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
	Rotilabo-magnetische Rührstäbchen; dreikant; 14x55 mm Nr. 1843.1	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
	Rotilabo-magnetische Rührstäbchen; dreikant; 18x80 mm Nr. 1844.1	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Membran für Western-Blot	Immobilon-FL PVDF; 0,45µm; 26,5 cm x 3,75m Nr. IPFL00010	Merck KgaA (Darmstadt)
Objektträgerkasten	Rotilabo- Objektträgerkästen; PS; 76x26 mm Nr. K532.1-K536.1	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Petrischalen	Petrischale mit Nocken, 100x20 mm; PS; unbeschichtet; unsteril Nr. 664102	Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster)
Pipettenspitzen	Pipettenspitze; 0,1-10 µL; farblos Nr. 70.1130	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
	Pipettenspitze; 0,5-20 µL; Kristall; PP Nr. 612-5714	VWR International GmbH (Erlangen)
	Pipettenspitze; 1-200 µL; gelb Nr. S1111-1006c	STARLAB GmbH (Hamburg)
	65 MultiFlex-Tips; 1-200 µL Nr. Y419.1	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
	Pipettenspitze; 100-1000 µL; blau Nr. 686290	Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster)

Material	Bezeichnung	Hersteller
Pipettenspitzen mit Filter	Biosphere Filter Tips; 0,1-10 µL; 96 Tips/Rack; sterile; non-pyrogenic; DNA/RNase-free Nr. 70.1130.210	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
	Biosphere Filter Tips; 2-20 µL; 96 Tips/Rack; sterile; non-pyrogenic; DNA/RNase-free Nr. 70.760.213	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
	Biosphere Filter Tips; 1-200 µL; 96 Tips/Rack; sterile; non-pyrogenic; DNA/RNase-free Nr. 70.760.211	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
	Biosphere Filter Tips; 50-1.000 µL; 100 Tips/Rack; sterile; non- pyrogenic; DNA/RNase- free Nr. 70.762.211	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Reaktionsgefäße	PCR-Reaktionsgefäß; 0,2 mL; PP, mehrfarbig Nr. 683271	Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster)
	PCR-Reaktionsgefäß; 0,5 mL; PP; mehrfarbig Nr. 682281	Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster)
	Reagiergefäß 1,5 mL; PP Nr. 72.690.001	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
	SafeSeal Reagiergefäß 2 mL; PP Nr. 72.695.400	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
	DNA LoBind Tubes; 1,5 mL Nr. 10051232	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
	Protein LoBind Tubes; 2 mL Nr. 10718894	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
	Schlauchfolie	PE; 200x0,2 mm Nr. 129-2132
Serologische Plastikpipetten	Pipette; 5 mL; graduated 1/10 mL; sterile Nr. 606180	Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster)
	Pipette; 10 mL; graduated 1/10 mL; sterile Nr. 607180	Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster)

Material	Bezeichnung	Hersteller
Serologische Plastikpipetten	Pipette; 25 mL; graduated 2/10 mL; sterile Nr. 760180	Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster)
	Pipette; 50 mL; graduated ½ mL; sterile Nr. 768180	Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster)
Sterile Erlenmeyerkolben	Corning; 125 mL Polycarbonate Erlenmeyer Flask with Vent Cap Nr. 431143	Corning Inc. (Corning, NY, USA)
Sterilfilter	Spritzenvorsatzfilter; Porengröße: 0,22 µm; Membran-Ø: 33 mm Nr. 7-9000	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH (Heidelberg)
Streifen für qPCR	PCR 8er Streifen; 0,2 mL; PP; Natur; unsteril Nr. 673210	Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster)
Zellkulturflaschen	Zellkulturflasche; 550 mL; 175 cm ² ; PS Nr. 660160	Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster)
	Zellkulturflasche; 250 mL; 75 cm ² ; PS Nr. 658170	Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster)
	Suspensionskulturflasche; 250 mL; PS Nr. 658190	Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster)
	Zellkulturflasche; 50 mL; 25 cm ² ; PS Nr. 690160	Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster)
Zellkulturplatten	Falcon; 6-Well; Clear; flat-bottom; w/ lid Nr. 353046	Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster)
	CellStar; 12-Well; PS; Clear; flat-bottom; w/ lid Nr. 665180	Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster)
	CellStar; 24-Well; PS; Clear; flat-bottom; w/ lid Nr. 662160	Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster)
	CellStar; 48-Well; PS; Clear; flat-bottom; w/ lid Nr. 677180	Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA)
	96-Well Microplate; PS; F-Bottom; white; non-Binding Nr. 655904	Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster)

Material	Bezeichnung	Hersteller
Zellkulturplatten	96-Well Microplate; U-Bottom; clear; non-sterile Nr. 650101	Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster)
	BD Falcon 96-Well Tissue Culture Plate; polystyrene; nonpyrogenic Nr. 353072	Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA)
Zellkulturschalen	Zellkulturschale; PS; 100x20 mm; Nocken; steril Nr. 664160	VWR International GmbH (Erlangen)
Zentrifugenröhrchen	CellStar tube; 15 mL; PP; 7x120 mm; conical bottom Nr. 188261	Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster)
	CellStar tube; 50 mL; PP; 30x115 mm; conical bottom Nr. 227261	Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster)
	Polyallomer; 13,2 mL, 14x89 mm Nr. 331372	Beckman Coulter, Inc. (Brea, CA, USA)
	Polyallomer; 38,5 mL, 25x89 mm Nr. 326823	Beckman Coulter, Inc. (Brea, CA, USA)
	Shandon EZ Doppel Cytofunnel Nr. A78710021	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

2.3 Chemikalien, Zusätze und Lösungen

Puffer und Lösungen wurden mit autoklaviertem, bidestilliertem Wasser (*Aqua B.* Braun, steril und pyrogenfrei, B. Braun AG, Melsungen) angesetzt.

Name	Bezeichnung	Hersteller
2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol (C ₁₅ H ₂₇ N ₃ O)	100 mL Nr. 36975.01	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg)
Aceton (C ₃ H ₆ O)	p.a. Nr. A1582,2500PE	AppliChem GmbH (Darmstadt)
AEC (3-Amino-9-ethylcarbazol) (C ₁₄ H ₁₄ N ₂)	20mg pro Tablette; 50Stk. Nr. A6926	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Agar-Agar	Bakteriologisch Nr. 2266.1	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)

Name	Bezeichnung	Hersteller
Agarose	peqGOLD Universal-Agarose; 500g Nr. 35-1020	VWR International GmbH (Erlangen)
Ammoniumsulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	$\geq 99,5\%$; p.a.; 1kg Nr. 3746.1	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
APS (Ammoniumperoxodisulfat) ($\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_2$)	$\geq 98\%$; p.a.; 100g Nr. 9592.2	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Aqua bidest. (Aqua B. Braun)	Ecotainer; PP; 500 mL; steril; pyrogenfrei Nr. PET82423E	B. Braun Melsungen AG (Melsungen)
ARALDITE Hardener HY 964	100 g Nr. 13826.01	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg)
Ascorbinsäure ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$)	100 g Nr. A-0278	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
bFGF (basic fibroblast growth factor)	10 μg Nr. 13256-029	Life Technologies GmbH (Darmstadt)
Borsäure (H_3BO_3)	$\geq 99,8\%$; p.a. Nr. 6943.1	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Bromphenolblau ($\text{C}_{19}\text{H}_9\text{Br}_4\text{O}_5\text{S} \cdot \text{Na}$)	Bromophenol Blue Na-salt Nr. 15375	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg)
BSA (bovine serum albumin)	heat shock fraction; pH 7; $\geq 98\%$ Nr. A7906	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Cacodylsäure-Natriumsalz Trihydrat ($\text{C}_2\text{H}_6\text{AsNaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)	fest; 100 g Nr. A2140,0100	AppliChem GmbH (Darmstadt)
CAP-T Express	w/o L-Glutamine Nr. F9219-1.0	Biochrom GmbH (Berlin)
Citronensäure Monohydrat ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	25 kg Nr. 85514.360	VWR International GmbH (Erlangen)
D(+)-Saccharose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$)	$\geq 99,5\%$; 5 kg; RNase/DNase-frei Nr. 9097.2	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Denaturierungsreagenz	Bolt LDS Sample Buffer (4x) Nr. B0007	Life Technologies GmbH (Darmstadt)
	2-Mercaptoethanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$) $\geq 99\%$; p.a.; 250 mL Nr. 4227.1	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
DEPC (Diethylpyrocarbonat) ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$)	$\geq 97\%$ Nr. K028.1	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)

Name	Bezeichnung	Hersteller
Desinfektionsmittel	Rnase-ExitusPlus™; 500 mL Nr. A7153,0500	AppliChem GmbH (Darmstadt)
	Terralin liquid; 35 g 1-Propanol, 25 g Ethanol (94% ig) Nr. 102001	Schülke & Mayr GmbH (Norderstedt)
	Barrycidal 36; 5 L Nr. 365000	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach)
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	≥99% ; p.a.; wasserfrei; 1 kg Nr. P030.2	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Di-Natriumtartrat-Dihydrat (C ₄ H ₄ Na ₂ O ₆ * 2H ₂ O)	zur Analyse; 1 kg Nr. A2662,1000	AppliChem GmbH (Darmstadt)
DMEM	4,5 g/L glucose and sodium bicarbonate, w/o L-Glutamine and sodium pyruvate Nr. D5671-500 ML	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
DMEM/F12	w/o L-Glutamine; 1:1 mixture of DMEM and Ham's F-12; high concentrations of glucose, amino acids and vitamins Nr. 21331-020	Life Technologies GmbH (Darmstadt)
DMF (N,N-Dimethylformamid) (C ₃ H ₇ NO)	250 mL Nr. D4254	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
DMSO (Dimethylsulfoxid) (C ₂ H ₆ OS)	Rotipuran ≥99,8% ; p.a. Nr. 4720.2	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	w/o Ca, Mg Nr. D8537-500 ML	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
EDTA (Ethylendiaminotetraessigsäure) (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ * 2H ₂ O)	Dinatriumsalz; Dihydrat; 100 g Nr. A3553,1000	AppliChem GmbH (Darmstadt)
EdU (5-Ethynyl-2'-desoxyuridin)	50 mg Nr. A10044	Life Technologies GmbH (Darmstadt)
Einbettmedium	ProTaqS PARAmount (w/o Xylene, Toluol); 500 mL; Mounting Media Nr. BP-167H	Quartett Immunodiagnostika, Biotechnologie + Kosmetik Vertriebs GmbH (Berlin)
	IFA Mounting Medium; 3 mL Nr IF0007	Focus Diagnostics, Inc. (Cypress, CA, USA)

Name	Bezeichnung	Hersteller
Einfrriermedium	ProFreeze™-CDM; 2X; 100 mL Nr. 12-769E	Lonza Group Ltd (Basel, Switzerland)
Essigsäure (C ₂ H ₄ O ₂)	100% ; p.a.; 1L Nr. 3738.4	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Ethanol (technisch) (C ₂ H ₅ OH)	99,8% (v/v); 1% MEK; entwässert Nr. 642	Martin und Werner Mundo OHG (Wiesbaden)
	96,5% (v/v); 1% MEK Nr. VE30198	Martin und Werner Mundo OHG (Wiesbaden)
Ethanol (vergällt) (C ₂ H ₅ OH)	≥70% ; mit ca. 1% MEK Nr. T913.1	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Farbstoff für Zellkerne	DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) Solid; 10 mg Nr. A1001,0010	AppliChem GmbH (Darmstadt)
	Hematoxylin solution modified acc. to Gill II Nr. 105175	Merck KGaA (Darmstadt)
FKS (fötale Kälberserum)	geprüft auf Endotoxine, Mykoplasmen, Viruskontamination, Virusantikörper Nr. S0115	Biochrom GmbH (Berlin)
Formaldehyd (CH ₂ O)	Rotipuran 37%; p.a.; ACS Nr. 4979.1	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Formamid (CH ₃ NO)	≥99,5%; p.a.; RNAse/DNAse-free Nr. P040.1	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Fuchsinfärbelösung	Fuchsin + Substrate Chromogen System Nr. K062511	Dako (Glostrup, Dänemark)
Glutaraldehyd (OHC(CH ₂) ₃ CHO)	Grade I; 25% in H ₂ O; 100 mL Nr. G6257	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Glycerin (C ₃ H ₈ O ₃)	≥99,5%, p.a., wasserfrei Nr. 3783.1	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Glycin (C ₂ H ₅ NO ₂)	≥99%; p.a.; 1 kg Nr. 3908.2	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)

Name	Bezeichnung	Hersteller
Isobutangas	Ventilkartusche mit Isobutangas; CP250; Nr. 202208	Camping Gaz GmbH (Hungen-Inheiden)
Isopropanol (C ₃ H ₈ O)	Isopropylalkohol; 1L Nr. GH 05001	Aug. Hedinger GmbH & Co. (Stuttgart)
Kaliumchlorid (KCl)	≥99.0%; 1 kg Nr. P9541	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	100 g Nr. JB4921-04	Avantor Performance Materials (Center Valley, PA, USA)
Kupfer(II)-sulfat (CuSO ₄ * 5H ₂ O)	Pentahydrat; ≥98%; 5 kg Nr. 8175.2	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
L-Alanyl-L-Glutamin	200 mM; 50 mL Nr. K0302	Biochrom GmbH (Berlin)
L-Glutamin	200 mM; 100 mL Nr. G7513-100ML	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Laufpuffer	Bolt MES SDS Running Buffer (20x) Nr. B0002	Life Technologies GmbH (Darmstadt)
LR White Resin	hard grade; 500 g Nr. AGR1280	PLANO GmbH (Wetzlar)
MEM	w/o L-Glutamine and HEPES Nr. 21090-055	Life Technologies GmbH (Darmstadt)
MEM Non-Essential Amino Acids Solution	100x; 100 mL Nr. 11140-035	Life Technologies GmbH (Darmstadt)
Methanol	for analysis; ACS; ISO Nr. 131091.1212	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Mowiol 4-88 (-CH ₂ CHOH-)n	50 g Nr. 0713.1	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
NaCl (Natriumchlorid)	≥99,5%, p.a. Nr. 3957.2	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
NaOH (Natriumhydroxid)	≥99%, p.a. Nr. 6771.2	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Natriumacetat (NaCH ₃ COO * 3H ₂ O)	≥99,5%; p.a. Nr. 6779.1	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	≥99,5%; p.a.; wasserfrei; 500 g Nr. A135.1	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	≥99,5%; p.a.; 1 kg Nr. 6885.1	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Natriumpyruvat (C ₃ H ₃ NaO ₃)	100 mM; 100 mL Nr. S8636	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

Name	Bezeichnung	Hersteller
n-Propylgallat (C ₁₀ H ₁₂ O ₅)	Powder; 100 g Nr. P3130	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
OptiPRO SFM	Serum-free; animal origin-free; low protein formulation Nr. 12309-019	Life Technologies GmbH (Darmstadt)
Osmium(VIII)-oxid (OsO ₄)	2% solution; 2 mL Nr. 23310-10	Polysciences, Inc. (Warrington, PA, USA)
PAA (Phosphonoessigsäure) (C ₂ PO ₅ H ₅)	98% Nr. 284270-10G	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Paraformaldehyd (CH ₂ O) _n	100 g Nr. 8187150100	Merck KGaA (Darmstadt)
Polymerase	Hot Star Taq Plus DNA Polymerase; 1000 Units Nr. 203605	Qiagen (Venlo, Limburg, NL)
Propidiumiodid (C ₂₇ H ₃₄ I ₂ N ₄)	1 mg/mL; 10 mL; solution in water Nr. P3566	Life Technologies GmbH (Darmstadt)
Propylenoxid (C ₃ H ₆ O)	99,9%; 500 mL Nr. 33715.03	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg)
Proteingel-Standard	SeeBlue Plus2 Pre-stained Protein Standard Nr. LC5925	Life Technologies GmbH (Darmstadt)
Proteingel-Standard	peqGOLD Prestained Protein Marker IV; 250 µL Nr. 27-2110	VWR International GmbH (Erlangen)
Proteinase K	lyophilisiert; ≥30 mAnson U/mg; aus Pilzen Nr. 7528.1	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Reduktionsreagenz	Bolt Sample Reducing Agent (10x) Nr. B0009	Life Technologies GmbH (Darmstadt)
Reinigungsmittel für die Durchflusszytometrie	Coulter Clenz Cleaning Agent Nr. 8448222	Beckman Coulter, Inc. (Brea, CA, USA)
Renlam M-1	Solvent-free; modified bisphenol A epoxy resin; 250 g Nr. 13825.01	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg)

Name	Bezeichnung	Hersteller
Ribonuclease A	from bovine pancreas; powder; ≥ 50 Kunitz units/mg Nr. R4875-100MG	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
	100 mg; lyophilized Nr. 740505	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren)
Roti-Chloroform/Isoamylalkohol	zur Extraktion von Nukleinsäuren; 24:1 Nr. X984.1	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Roti-Phenol/Chloroform/ Isoamylalkohol	zur Extraktion von Nukleinsäuren; 25:24:1; pH 7.5-8.0 Nr. A156.3	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Rotiphorese Gel 30	Stammlösung im Verhältnis 37,5:1 Nr. 3029.1	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
TEMED (Tetramethylethyldiamin) (C ₆ H ₁₆ N ₂)	99% ; p.a. Nr. 2367.3	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Tri-Natriumcitrat Dihydrat (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ * 2H ₂ O)	$\geq 99\%$; p.a.; 1 kg Nr. 3580.1	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
TRIS (2-Amino-2-(hydroxymethyl)- 1,3-propandiol) (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Pufferan; $\geq 99,9\%$ Nr. 9090.2	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Triton X 100	reinst; nichtionisches Detergens Nr. 3051.3	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Trypanblau (C ₃₄ H ₂₈ N ₆ O ₁₄ S ₄)	0.4% ; liquid; sterile-filtered Nr. T8154	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Trypsin-EDTA (0,5%)	10x; 100 mL; w/o phenol red Nr. 15400-054	Life Technologies GmbH (Darmstadt)
Trypton	Trypton/Pepton aus Casein Nr. 8952.3	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Tween 20 (C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆)	for synthesis Nr. 8.22184.0500	Merck KgaA (Darmstadt)
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	30% ; 1 L Nr. 8070.1	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Xylencyanol (C ₂₅ H ₂₇ N ₂ NaO ₆ S ₂)	Farbstoff zur Laufmarkierung in der Gelelektrophorese Nr. 38505	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg)
Xylol (C ₈ H ₁₀)	5 L Nr. A2476,5000	AppliChem GmbH (Darmstadt)

2.4 Kits

Bezeichnung	Hersteller
Venor GeM-Mykoplasmen Detektionskit	Nr. 11-1100 Minerva Biolabs GmbH (Berlin)
Roti-Black P Silberfärbung	Nr. L533.1 Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Pierce BCA Protein Assay Kit	Nr. 23225 Life Technologies GmbH (Darmstadt)
Bright-Glo Luciferase Assay System	Nr. E2620 Promega GmbH (Mannheim)
Taq PCR Core Kit (1000 Units)	Nr. 201225 Qiagen (Venlo, Limburg, NL)
High Pure Viral Nucleic Acid Kit	Nr. 11858874001 Roche Holding AG (Basel, Schweiz)

2.5 Kultivierungsbedingungen von Säugerzellen

Um eine Kontamination mit Mikroorganismen zu vermeiden, wurden sämtliche Arbeiten mit eukaryotischen Zellen an einer Sterilbank unter Verwendung von sterilen Glas- und Plastikwaren durchgeführt. Die Kultivierung aller Zellen erfolgte bei einer Temperatur von 37°C, einem CO₂-Gehalt von 5% und einer relativen Luftfeuchte von 95%. Die Kultivierung adhärenter Zellen erfolgte in 75 cm² oder 175 cm² Zellkulturflaschen. Suspensionszellen wurden in 125 mL Erlenmeyerkolben unter Schütteln bei 260 rpm in einem Corning LSE *Orbital Shaker* kultiviert. Zur Bestimmung der Zellzahlen wurden die Zellen für 5min bei 1500 rpm (HFF), 1200 rpm (HEK293) bzw. 900 rpm (CAP_{sus.}; CAP_{adh.}) in einer Megafuge 2.0 pelletiert und in einem geeigneten Volumen des jeweiligen Mediums aufgenommen. In regelmäßigen Abständen wurden die Zellkulturen mittels des „VenorGeM-Mykoplasmen-Detektionskits“ auf Kontamination mit Mykoplasmen untersucht. Bei einem Mykoplasmenbefall wurden die jeweiligen Zellkulturen mit der Antibiotika-Kombination BM Cyclin nach Herstellerangaben behandelt.

2.5.1 Puffer und Lösungen

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)

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

Trypanblau

0,4% (v/v) in 85% (w/v) NaCl-Lösung

Endkonzentration 0,1% (v/v) Verdünnung 1:4 in 1xPBS

Trypsin/ EDTA

0,5 g/L Trypsin; 0,2 g/L EDTA in 1xPBS (10x), 1:10 in Aqua B. Braun

2.5.2 Medien und Medienzusätze

Das zu den meisten Medien zugesetzte fötale Kälberserum (FKS) wurde vor Verwendung für 45min bei 56°C hitzeinaktiviert. Als pH-Indikatorfarbstoff diente in sämtlichen Zellkulturmedien, mit Ausnahme von CAP-T Express, Phenolrot.

Basic fibroblast growth factor (bFGF)

10 µg bFGF; lyophilisiert

Endkonzentration 0,1 mg/mL (w/v) Verdünnung 1:10 in 10 mM; pH 7.6 TRIS-HCl + 0,1% Rinderserumalbumin (BSA; *bovine serum albumin*)

MEM + 5% FKS

Minimum Essential Medium mit 5% (v/v) hitzeinaktiviertem FKS; 2 mM L-Glutamin; 50 mg/L Gentamycin; 0,5 ng/mL bFGF

MEM + 10% FKS

Minimum Essential Medium mit 10% (v/v) hitzeinaktiviertem FKS; 2 mM L-Glutamin; 50 mg/L Gentamycin; 0,5 ng/mL bFGF

DMEM/F12 + 10% FKS

Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's Nutrient Mixture F-12 (1:1) mit 10% (v/v) hitzeinaktiviertem FKS; 2,5 mM L-Glutamin; 50 mg/L Gentamycin

OptiPRO SFM + 10% FKS

OptiPRO serum-free media mit 10% (v/v) hitzeinaktiviertem FKS; 4 mM L-Alanyl-L-Glutamin; 50 mg/L Gentamycin

DMEM + 10% FKS

Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose mit 10% (v/v) hitzeinaktiviertem FKS; 2 mM L-Glutamin; 1x MEM *Non-Essential Amino Acids Solution*; 1 mM *Sodium Pyruvate*; 50 mg/L Gentamycin

CAP-T Express

CAP-T Express; 6 mM L-Alanyl-L-Glutamin; 50 mg/L Gentamycin

Einfriermedium

90% (v/v) FKS; 10% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO)

2.5.3 Antibiotika

Antibiotika	Stocklösung	Endkonzentration	Bezugsquelle
BM-Cyclin 1	2,5 mg/mL	10 µg/mL	Nr. 10799050001 Roche Holding AG (Basel, Schweiz)
BM-Cyclin 2	1,25 mg/mL	5 µg/mL	Nr. 10799050001 Roche Holding AG (Basel, Schweiz)
Gentamycin	50 mg/mL	50 µg/mL	Nr. 15750-037 Life Technologies GmbH (Darmstadt)

2.5.4 Zellen und Zelllinien

Adhärenenten Zellen wurden bei vollständiger Konfluenz gesplittet. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit 1xPBS gewaschen, anschließend durch Zugabe einer Trypsin-EDTA-Lösung für 5min bei 37°C vom Zellkulturboden abgelöst und nach Abstoppen der Reaktion mit jeweiligem Medium pelletiert und daraufhin gezählt. Entsprechend ihrer benötigten Zellzahl wurden die Zellen in neue Zellkulturflaschen, -schalen oder -lochplatten ausgesät. Suspensionszellen wurden nach vollständiger Trübung des Kultur-mediums gezählt und errechnete Volumina für die erneute Aussaat aus dem Erlen-meyerkolben entnommen. Daraufhin wurden die Zellen mittels Zentrifugation pelletiert, in jeweiligem Medium aufgenommen und in 125 mL Erlenmeyerkolben ausgesät.

Primäre humane Vorhautfibroblasten (HFF; *human forskin fibroblast*)

Bei den humanen Vorhautfibroblasten handelt es sich um Zellen, die für die Infektion mit HCMV permissiv sind. Für Experimente wurden Zellpassagen zwischen 10 und 25

verwendet. Für die Weiterhaltung der Zellen sowie für Experimente wurde MEM + 5% FKS verwendet, für Rekonstitutionen von Virusstämmen wurde hingegen MEM + 10% FKS verwendet.

Humane Retinapigmentepithelzellen (ARPE-19; *adult retinal pigment epithelium-19*)

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um retinales Pigmentepithel eines 19-jährigen männlichen Spenders. Die Zelllinie wurde von der Firma ATCC (*American Type Culture Collection*; Manassas, VA, USA) mit der Nummer CRL-2302 bezogen und für Experimente zwischen den Passagen 10 und 25 verwendet. Für die Weiterhaltung der Zellen sowie für Experimente wurden die Zellen in DMEM:F12 1:1 + 10% FKS kultiviert.

Humane embryonale Nierenzelle (HEK293; *human embryonic kidney 293*)

HEK293 ist eine hypotriploide Epithelzelllinie, die durch Transformation einer humanen embryonalen Nierenzelle mit viraler DNA des humanen Adenovirus 5 entstanden ist (4,5kb des viralen Genoms). Die Zelllinie wurde von der Firma ATCC mit der Nummer CRL-1573 bezogen. Für die Weiterhaltung der Zellen sowie für Experimente wurden die Zellen in DMEM + 10% FKS kultiviert.

Humane Lungenfibroblasten (MRC-5; *Medical Research Council-5*)

MRC-5 ist eine diploide humane Zelllinie, die von Lungengewebe eines 14-Wochen alten männlichen Fetus erhalten wurde. Die Zelllinie wurde vom Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie (Leipzig) bezogen. Für Experimente wurden Passagen zwischen 19 und 28 verwendet. Zur Weiterhaltung der Zellen sowie für Experimente wurden die Zellen in MEM + 10% FKS kultiviert.

Humane immortalisierte Amniozyten (CAP; *Cevec's Amniocyte Production*)

Primäre humane Amniozyten wurden mit den adenoviralen Proteinen E1 und pIX des Adenovirus Typ 5 transformiert und so immortalisiert (Schiedner et al., 2000). Die erhaltene CAP-Zelllinie kann (Klon Z78-5B3-1D5S) sowohl unter adhärenenten Bedingungen (CAP_{adh.}) wie auch in Suspension (CAP_{sus.}) kultiviert werden. CAP_{adh.} und CAP_{sus.} wurden von Cevec Pharmaceuticals GmbH (Köln) zur Verfügung gestellt. Zur Weiterhaltung sowie für Experimente wurden die CAP_{adh.} in OptiPro + 10% FKS und die CAP_{sus.} in CAP-T Express kultiviert.

2.5.5 Bestimmung der Zellzahl und der Zellvitalität

Die Zellzahl lebender Zellen sowie die Vitalität wurden durch Zugabe von Trypanblau bestimmt. Bei toten oder sterbenden Zellen kommt es zu einem Verlust der Membranintegrität wodurch dieser Farbstoff in die Zellen eindringen und diese blau anfärben kann. Lebende Zellen hingegen bleiben ungefärbt. Für die Bestimmung der Zellzahl wurde eine 1:1 Verdünnung aus Zellsuspension und Trypanblau auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben und die ungefärbten Zellen gezählt. Die Zellzahl pro mL wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl/mL} = \frac{N}{n} \times V \times 10^4$$

N = Anzahl gezählter Zellen; n = Anzahl ausgezählter Großquadrate;

V = Verdünnungsfaktor; 10^4 = Kammerfaktor

2.5.6 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen

Zur Langzeitlagerung von humanen Zellen bei -80°C oder in flüssigem Stickstoff wurden $2,5 \times 10^6$ bis 5×10^6 Zellen pelletiert und das Pellet anschließend in 1 mL Einfriermedium resuspendiert. Die Suspension wurde daraufhin zügig in spezielle Einfrierröhrchen überführt. Diese wurden in Einfrierboxen langsam abgekühlt. Anschließend erfolgte die Lagerung. Eine langsame Abkühlung sowie der Zusatz von DMSO verhindern, dass sich Eiskristalle bilden, die wiederum die Zellen schädigen könnten. Für die Rekultivierung eingefrorener Zellen wurden diese zügig bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und in jeweiliges, auf Raumtemperatur erwärmtes, Medium überführt. Um die zytotoxische Wirkung des DMSO zu minimieren, wurden die Zellen durch einen Zentrifugationsschritt pelletiert, in frischem Medium aufgenommen und daraufhin ausgesät.

2.6 Anzuchtbedingungen von Viren

2.6.1 Lösungen und Zusätze

Phosphonoessigsäure (PAA)

Stock (-20°C): 50 mg/mL in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$. (steril filtriert)

Acetat-Puffer

13,6 g/L Natrium-Acetat x $3\text{H}_2\text{O}$; 2,88 mL/L Eisessig; pH 4.9

3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC)

Stock (- 20°C) 4 mg/mL in N,N-Dimethylformamid (DMF)

AEC-Färbelösung

AEC-Stammlösung 1:20 in Acetat-Puffer versetzt mit 1:1.000 H₂O₂ (30%)

0,04 M Natriumphosphat-Puffer

1,1 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (NaH₂PO₄ x H₂O) und 5,7 g Di-Natriumphosphat-Dihydrat (Na₂HPO₄ x 2 H₂O) in 1 L *Aqua B. Braun* (autoklaviert); pH 7.4

Natriumtartrat 35%

207,5 g Natriumtartrat in 325 mL 0,04 M Natriumphosphat-Puffer (autoklaviert)

Natriumtartrat 15%

88,9 g Natriumtartrat und 150 mL Glycerin in 275 mL 0,04 M Natriumphosphat-Puffer (autoklaviert)

2.6.2 Virusstämme

Rekombinantes Virus (RV)-HB5

Das rekombinante Virus RV-HB5 wurde durch Rekonstitution des *Bacterial Artificial Chromosomes* (BACmid; BAC) pHB5 in HFF generiert, welches freundlicherweise von Prof. Dr. Ulrich Koszinowski zur Verfügung gestellt wurde (Borst et al., 1999; Hahn et al., 2002; Besold et al., 2007). Das BAC-System macht eine genetische Manipulation des Virusgenoms in Bakterien möglich und basiert auf dem *single copy* F-Plasmid von *E. coli*. BACs sind geeignet DNA-Fragmente von über 300kb aufzunehmen und zu replizieren (Shizuya et al., 1992). In RV-HB5 wurde im Austausch der Genomregion US2-US6 des HCMV-Laborstammes AD169 (Rowe et al., 1956) der BAC-Vektor inseriert. Die Deletion der viralen Gene US1-US6 hat keinen Einfluss auf die Wachstumskinetik der Mutanten (Jones et al., 1992).

RV-TB40/E-BAC7

Der Stamm RV-TB40/E ist ein kliniknahes Isolat von HCMV, welcher in der Lage ist Endothelzellen lytisch zu infizieren (Sinzger et al., 1999). Er ist damit endotheliotrop. Das BACmid dieses Stammes wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Sinzger zur Verfügung gestellt, dessen Herstellung analog zu der Herstellung von RV-TB40/E-BAC4 erfolgte (Sinzger et al., 2008b). Dabei wurden die Gene US2-US6 des HCMV Genoms durch das

BAC ersetzt. Das Virus wurde durch Rekonstitution des BACmids pTB40/E-BAC7 in HFF erhalten.

RV-TB40/E-BAC7pp65

Dieses Virus wurde von Dr. Caroline Sauer durch Rekonstitution des BACmids pTB40/E-BAC7pp65 in HFF generiert. Es enthält eine weitere Kopie des pp65-Gens (UL83) unter Kontrolle des *major immediate early*-Promotors (MIEP) (Boshart et al., 1985). Das pp65-Gen wurde im Austausch gegen die genomische Region UL106-UL109 von HCMV (Marchini et al., 2001) inseriert. Diese Region kodiert für das IE4-Transkript und ist für die Replikation von HCMV in HFF nicht essentiell (Pepperl et al., 2000).

RV-TB40/E- Δ UL16EGFP

Das Virus RV-TB40/E- Δ UL16EGFP wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Sinzger zur Verfügung gestellt. Hierfür wurde das rekombinante Plasmid UL15/EGFP/UL16+17 in den Zellkern von AD169-infizierten HFF injiziert und diese anschließend auf EGFP-Expression untersucht. Virusüberstände grün fluoreszierender Zentren wurden mittels *limited dilution cloning* aufgereinigt. Der daraus resultierende Virusstamm exprimiert EGFP unter der Kontrolle des frühen UL16-Promotors von HCMV (Digel et al., 2006).

RV-TB40/E-UL84Luc

Das rekombinante Virus RV-TB40/E-UL84Luc wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Thomas Stamminger zur Verfügung gestellt. Die Luciferase-Expressionskassette ist hier unter der Kontrolle des frühen HCMV UL84-Promotors. Die Struktur des Stammes ist identisch mit der des Stammes HB15-UL84prLuc (Pöttsch et al., 2011).

RV-TB40/E-BAC4 Δ UL5-9

Das Virus wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Barbara Adler zur Verfügung gestellt. Ausgehend von BACmid pTB40/E-BAC4 (Sinzger et al., 2008b) wurde BACmid pTB40/E-BAC4 Δ UL5-9 generiert. Im Austausch der viralen *open reading frames* (ORFs) UL5-9 wurde eine Luciferase-Expressionskassette unter Kontrolle des SV40 Promotors inseriert (Scrivano et al., 2011). Das entsprechende Virus wurde durch Rekonstitution des BACmids in HFF generiert.

RV-Towne

Das Virus RV-Towne, freundlicherweise von Prof. Dr. Edward S. Mocarski zur Verfügung gestellt, wurde durch Rekonstitution des pTowne-BAC in HFF erhalten. In diesem Virus wurde die genomische Region US1-US11 gegen den BAC-Vektor ausgetauscht (Marchini et al., 2001; Dunn et al., 2003). Das BACmid pTowne-BAC wiederum beruht auf dem Laborstamm Towne (Plotkin et al., 1975).

RV-TowneUL130rep

Das Virus wurde von Dr. Caroline Sauer durch Rekonstitution des BACmids pTowne-BAC in HFF generiert. Der mutierte Leserahmen UL130 des Stamms Towne wurde hierbei gegen UL130 des pTB40/E-BAC7 ausgetauscht. Durch diesen Austausch wurde der Endotheltropismus des Stamms Towne wiederhergestellt.

2.6.3 Infektion eukaryotischer Zellen mit HCMV

2.6.3.1 Infektion adhärenter, eukaryotischer Zellen mit HCMV

Für die Infektion mit HCMV wurden subkonfluente HFF, HEK293, ARPE-19, MRC-5 oder CAP_{adh.} verwendet. Das Zellkulturmedium wurde abgenommen und die gewünschte Menge an Virus in einem geringen Volumen auf die Zellen gegeben. Das sogenannte Infektionsvolumen wurde so gewählt, dass die Zellen gerade noch mit Medium bedeckt waren. Damit sollte eine optimale Adsorption der Viren an die Zelle gewährleistet werden. Anschließend wurden die Zellen für 1,5h bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde 0,14 M NaCl / 0,1 M Glycin (pH 3.0)-Lösung für 1min zugesetzt, um an der Zelloberfläche verbliebene Viren zu inaktivieren. Nach einem Waschschrift mit 1xPBS wurde den infizierten Zellen jeweiliges Medium in ausreichendem Volumen zugesetzt und diese bis zur weiteren Verwendung bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Die jeweilig für den Versuch notwendige Infektionsdosis wurde vorab entweder anhand der Anzahl IE1-positiver Zellen nach Infektion oder anhand der Genomkopienzahl pro Zelle bestimmt.

2.6.3.2 Infektion eukaryotischer Suspensionszellen mit HCMV

Für die Infektion von CAP_{sus.} mit HCMV wurden die Zellen zunächst gezählt, zentrifugiert und anschließend auf eine Konzentration von $2,5 \cdot 10^5$ /mL eingestellt. Die gewünschte Menge an Virus wurde in einem geringen Volumen auf die Zellen gegeben. Diese wurden im Anschluss für 2h bei 37°C und 5% CO₂ in einem Corning LSE *Orbital Shaker*

bei 80 rpm in 125 mL Erlenmeyerkolben geschüttelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen für 1min mit 0,14 M NaCl / 0,1 M Glycin (pH 3.0)-Lösung versetzt, zentrifugiert und mit 1xPBS gewaschen. Anschließend wurde das Infektionsvolumen mit CAP-T Express auf 10 mL aufgefüllt und die Zellen bis zur weiteren Verwendung bei 37°C, 5% CO₂ und 200 rpm inkubiert.

2.6.3.3 Behandlung infizierter Zellen mit Phosphonoessigsäure (PAA; *Phosphonoacetic acid*)

Um die Menge an neu synthetisierten Viruspartikeln in der Zelle sowie im Virusüberstand zu bestimmen, muss zuvor ausgeschlossen werden, dass es sich bei den gemessenen Werten um initial zugegebenen Virus handelt (*Input*). Hierfür wurden in verschiedenen Versuchsansätzen parallel subkonfluente HFF, HEK293, CAP_{adh.} und CAP_{sus.}, wie in 2.6.3.1 und 2.6.3.2 beschrieben, infiziert und anschließend jeweils ein Ansatz mit 0,25 mg/mL Phosphonoessigsäure (PAA; *Phosphonoacetic acid*) versetzt. PAA inhibiert spezifisch die Replikation von HCMV durch Hemmung der viralen DNA-Polymerase. Dieser Vorgang ist reversibel und kann durch Austausch des Kulturmediums aufgehoben werden (Huang, 1975).

2.6.4 Herstellung virushaltiger Zellkulturüberstände

Zur Herstellung virushaltiger Zellkulturüberstände wurden subkonfluente HFF mit HCMV infiziert und sechs bis acht Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Bei deutlich erkennbarem zytopathischen Effekt (CPE) wurde der Zellkulturüberstand geerntet und bei 2800 rpm für 10min in einer Megafuge 2.0 zentrifugiert, um im Überstand vorhandene Zelltrümmer zu entfernen. Daraufhin wurde 1 bis 10 mL Aliquots des Überstands hergestellt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.6.5 Bestimmung des Virustiters über IE1-positive Zellen

Nach Infektion mit HCMV kommt es zur Expression viraler Proteine, wobei das Immediate Early Protein 1 (IE1) besonders früh und abundant gebildet wird. Dies ermöglicht die Bestimmung des Virustiters anhand der Anzahl an IE1-positiven Zellen. Diese Zahl wird als Maß für infektiöse Partikel in einem definierten Volumen Virusüberstand herangezogen. Für die Bestimmung des Virustiters über Auszählung IE1-exprimierender Zellen wurden 5*10⁵ HFF pro Vertiefung in 96-Lochplatten ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit den zu testeten Virusüberständen infiziert. Hierfür wurden die Virusüberstände zunächst im Verhältnis 10⁻³ und 10⁻⁴ verdünnt und jeweils 100 µL dieser Verdünnungen in Achtfachansätzen auf die Zellen

gegeben. 48h nach Infektion wurden die infizierten Zellen zunächst mit 1xPBS gewaschen und anschließend für 20min mit 96% Ethanol bei Raumtemperatur fixiert. Nach einem erneuten Waschschrift mit 1xPBS wurden die IE1-positiven Zellen angefärbt. Dafür wurde den Zellen zunächst 50 μ L Hybridomüberstand des IE1-spezifischen, monoklonalen Antikörpers p63-27 (Andreoni et al., 1989) zugesetzt und für 1h bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Mit Hilfe eines Meerrettich-Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörpers (*horseradish peroxidase*; HRP), der spezifisch gegen Maus-IgG gerichtet ist, konnte der gebundene IE1-spezifische Antikörper detektiert werden. Nach zwei Waschschriften mit 1xPBS wurden 50 μ L der Antikörperverdünnung (1:500 in 1xPBS) auf die Zellen gegeben und erneut für eine Stunde bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Anfärbung der infizierten, IE1-positiven Zellen erfolgte nach zwei weiteren Waschschriften mit 1xPBS durch Zugabe von 100 μ L einer 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC)-Färbelösung pro Vertiefung. AEC wiederum ist ein Substrat für die Meerrettich-Peroxidase. Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C in einer feuchten Kammer wurde die Farbreaktion durch Waschen mit 1xPBS abgestoppt. Zur mikroskopischen Auszählung wurde pro Vertiefung 200 μ L 1xPBS auf die Zellen gegeben. Für die Bestimmung des Virustiters wurde pro Virus und Verdünnung jede der acht Vertiefungen ausgezählt und daraus der Mittelwert gebildet. Der Virustiter konnte anschließend mit nachfolgender Formel bestimmt werden:

$$\frac{\text{Anzahl infektiöser Partikel}}{\text{mL}} = N \times V \times 10$$

N = Mittelwert der Anzahl an IE1 – positiven Zellen aus 8 Vertiefungen

V = Verdünnungsfaktor $\times 10 =$

Umrechnung des Infektionsvolumens von 100 μ L auf 1 mL

2.6.6 Aufreinigung viraler Partikel aus Zellkulturüberstand

Die im Zuge des viralen Replikationszyklus gebildeten Partikel (NIEPs, Virionen, Dense Bodies) können aus Zellkulturüberstand mittels eines positiven Dichte-/ negativen Viskositäts-Gradienten-Systems getrennt und aufgereinigt werden (Talbot et al., 1977; Irmire et al., 1983). Zur Aufreinigung der Viruspartikel wurde der Zellkulturüberstand von infizierten CAP_{adh.} sieben Tage nach Infektion geerntet und bei 2500 rpm für 10min in einer Megafuge 2.0 von Zelltrümmern befreit. Der Überstand wurde anschließend vorsichtig in Polyallomer Zentrifugenröhrchen, mit einem Fassungsvermögen von 38,5 mL, überführt und die viralen Partikel in einer Ultrazentrifuge im Rotor 45Ti bei

30000 rpm für 70min / 10°C pelletiert. Das Pellet wurde daraufhin in 1 mL 1xPBS resuspendiert und zur Auftrennung der unterschiedlichen viralen Partikel auf einen Dichte-Gradienten geschichtet. Dieser setzte sich aus 4 mL einer 35% Na-Tartrat-Lösung und 5 mL einer 15% Na-Tartrat-Lösung in Polylallomer Zentrifugenröhrchen mit einem Fassungsvermögen von 13,2 mL zusammen. Die Auftrennung erfolgte in einem SW41-Rotor bei 23000 rpm (60 min, 10°C) ohne Bremse und mit langsamer Beschleunigung. Die Lokalisation der drei Partikelformen im Gradienten wurde anschließend im Auflicht sichtbar gemacht (Abb. 1). Dense Bodies finden sich aufgrund ihrer variablen Größe und Dichte in einer relativ diffusen Bande unterhalb der Banden von NIEPs und Virionen. Die dünne und scharfe Virionen-Bande befindet sich oberhalb der Dense Bodies, während die deutliche Bande der NIEPs aufgrund ihrer geringeren Dichte oberhalb der anderen Partikelfractionen im Gradienten zu finden ist.

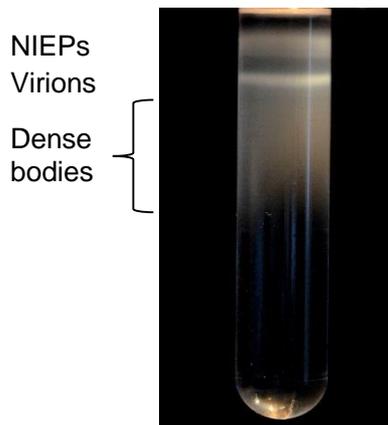


Abbildung 1: Dichtegradient einer HCMV-Partikelreinigung aus HFF. Die Lokalisation der drei viralen Partikelfractionen ist links dargestellt.

Die jeweilige Partikelbande wurde mit einer Kanüle abgezogen und auf 10 mL mit 1xPBS aufgefüllt. Daraufhin wurden die Partikel in einem weiteren Zentrifugationsschritt in einem SW41 Rotor bei 24000 rpm für 90min bei 10°C erneut pelletiert. Das NIEPs-Pellet wurde in 100 µL, die Virionen- und Dense Bodies-Pellets in 50 µL 1xPBS aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 Isolierung von DNA

2.7.1.1 Isolierung viraler DNA aus infizierten Zellen bzw. aus Zellkulturüberstand

Virale DNA aus infizierten HFF, HEK293, CAP_{sus.} oder CAP_{adh.} sowie aus virushaltigem Zellkulturüberstand wurde mit Hilfe des „High Pure Viral Nucleic Acid“-Kit von Roche nach Herstellerangaben isoliert. Zur Isolierung von viraler DNA aus infizierten Zellen wurden 100 µL einer Zellsuspension, eingestellt auf $1 \cdot 10^6$ Zellen/mL, verwendet, während für die Isolierung aus virushaltigem Zellkulturüberstand 200 µL eingesetzt wurden. Bis zur weiteren Verwendung wurde die isolierte virale DNA bei -20°C gelagert.

2.7.2 Quantitative *real-time* PCR (Taqman™ PCR; qPCR)

Die Methode der quantitativen *real-time* PCR (qPCR) dient der Vervielfältigung und gleichzeitigen Quantifizierung einer bestimmten *Template*-DNA, zum Beispiel der von viralen Genomen. Hierfür finden sogenannte Taqman™-Sonden Verwendung, welche an ihrem 5'-Ende ein Reporter-Fluorochrom und am 3'-Ende ein Quencher-Fluorochrom tragen (Livak et al., 1995). Das Emissionsspektrum des Reporter-Fluorochroms überlappt dabei mit dem Absorptionsspektrum des Quencher-Fluorochroms. Durch die räumliche Nähe der beiden Fluorochrome zueinander entsteht durch Energieübertragung der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET), wodurch die Fluoreszenz des Reporter-Fluorochroms nahezu unterdrückt wird. Die TaqMan™-Sonde, die aufgrund von komplementären Sequenzen an die *Template*-DNA gebunden ist, wird im Laufe der Elongation durch eine Taq-Polymerase mit 5'-3'-Exonukleaseaktivität hydrolysiert. Dadurch kommt es zu einer räumlichen Trennung beider Fluorochrome voneinander, wodurch die Fluoreszenz des Reporter-Fluorochroms nicht länger unterdrückt wird und detektiert werden kann. Die Zunahme der Fluoreszenz ist dabei proportional zur Menge an freigesetztem Reporter-Fluorochrom und somit zur Menge an vorhandener *Template*-DNA im Reaktionsansatz.

2.7.2.1 Durchführung einer qPCR

Die quantitative PCR-Analyse von genomischer, viraler DNA wurde anhand der Amplifikation des UL54 Gens von HCMV durchgeführt. UL54 kodiert für die katalytische Untereinheit der viralen DNA-Polymerase. Eine Verdünnungsreihe des Cosmids pCM1049 (Fleckenstein et al., 1982) wurde als Standard mitgeführt und diente zur Quantifizierung der Probe. Verwendete TaqMan™-Sonde war UL54 spezifisch (5'-

CCACTTTGCCGATGTAACGTTTCTTG CAT-3'). Als Reporter-Fluorochrom wurde 6-Carboxyfluorescein (FAM) und als Quencher-Fluorochrom Tetramethylrhodamin (TAMRA) verwendet (Becke et al., 2010). Als Referenzfarbstoff diente 6-Carboxyl-X-Rhodamin (ROX). TaqMan™-Sonde und Referenzfarbstoff wurden über die Firma TIB MOLBIOL GmbH, Berlin bezogen. Ein PCR-Ansatz umfasste ein Volumen von 50 µL und beinhaltete neben 5 µL *Template*-DNA bzw. Standard-DNA oder *Aqua* B. Braun folgende Bestandteile in den jeweiligen Endkonzentrationen:

- 1xPCR-Puffer; inklusive 1,5 mM MgCl₂
- 1 mM MgCl₂
- 0,2 mM dNTPs
- 0,3 µM CMV-FP
- 0,3 µM CMV-RP
- 0,1 µM TaqMan™-Sonde
- 0,5 µM 6-Carboxyl-X-Rhodamin (ROX)
- 2,5 U Hot Star-Taq

Im *real-time* Cycler ABI Prism 7500 wurde die Reaktion mit folgenden Bedingungen durchgeführt:

- Initialisierung bei 95°C für 5 min
- Denaturierung bei 94°C für 15 sec
- Hybridisierung + Elongation bei 60°C für 1 min

Die Schritte Denaturierung, Hybridisierung und Elongation wiederholten sich für 45 Zyklen. Ausgewertet wurde die Messung unter Zuhilfenahme der Betriebssoftware und Erstellung einer Eichgeraden, die aus den Messwerten der Standardreihe erstellt wurde.

2.7.3 Antikörper

2.7.3.1 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Primärantikörper

Bezeichnung	Isotyp	Verdünnung	Bezugsquelle
Anti-IE1	Maus IgG (p63-27)	unverdünnt	(Andreoni et al., 1989)
Anti-CMV pp28	Maus IgG2a (5C3)	1:50	sc-56975 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, TX, USA)
Anti-pp65	Maus IgG2b, <i>kappa</i> (p65-33)	1:10	Dr. W. Britt (Birmingham, AL, USA)
Anti-IE2	Maus IgG3, <i>kappa</i> (2-9-5)	unverdünnt	(Shimamura et al., 2010)
Anti-Ad5 E1A	Maus IgG2a, <i>kappa</i> (M58)	1:400	MA5-13643 Life Technologies GmbH (Darmstadt)
normal Maus IgG	Maus IgG	1:100	sc-2025 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, TX, USA)

Sekundärantikörper

Bezeichnung	Isotyp	Verdünnung	Bezugsquelle
Alexa Fluor 488 Azid		1:250	A10266 Life Technologies GmbH (Darmstadt)
Alexa Fluor 647 anti-Maus	Ziege IgG (H + L)	1:2000	A-21236 Life Technologies GmbH (Darmstadt)

2.7.3.2 Antikörper für die Immunfluoreszenz

Primärantikörper

Bezeichnung	Isotyp	Verdünnung	Bezugsquelle
Anti-IE1	Maus IgG (p63-27)	unverdünnt	(Andreoni et al., 1989)
Anti-pp65	Maus IgG2b, <i>kappa</i> (p65-33)	1:10	Dr. W. Britt (Birmingham, AL, USA)
Anti-PML	Kaninchen IgG (H-238)	1:200	sc-5621 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, TX, USA)

Sekundärantikörper

Bezeichnung	Isotyp	Verdünnung	Bezugsquelle
FITC anti-Maus	Kaninchen IgG	1:50	F0261 Dako (Glostrup, Dänemark)
Alexa Fluor 546 anti-Kaninchen	Ziege IgG (H + L)	1:250	A-11035 Life Technologies GmbH (Darmstadt)
Alexa Fluor 488 anti-Maus	Ziege IgG (H + L)	1:250	A-11029 Life Technologies GmbH (Darmstadt)

2.7.3.3 Antikörper für den Western-Blot

Primärantikörper

Bezeichnung	Isotyp	Verdünnung	Bezugsquelle
Anti- β -Aktin	Maus IgG1 (mAbcam 8226)	1:1000	ab8226 Abcam (Cambridge, UK)
Anti-pp65	Maus IgG2b, <i>kappa</i> (p65-33)	1:500	Dr. W. Britt (Birmingham, AL, USA)
Anti-pUL44	Maus IgG (BS510)	unverdünnt	Biotest AG (Dreieich)
Anti-Ad5 E1A	Maus IgG2a, <i>kappa</i> (M58)	1:400	MA5-13643 Life Technologies GmbH (Darmstadt)

Sekundärantikörper

Bezeichnung	Isotyp	Verdünnung	Bezugsquelle
IRDye 800 anti-Maus IgG (H + L)	Esel IgG	1:5000	610-732-124 Rockland Immunochemicals Inc. (Limerick, PA, USA)
Alexa Fluor 680 anti-Kaninchen	Esel IgG (H + L)	1:400	A10043 Life Technologies GmbH (Darmstadt)

2.7.3.4 Antikörper für die alkalische Phosphatase-anti-alkalische Phosphatase-Färbung

Primärantikörper

Bezeichnung	Isotyp	Verdünnung	Bezugsquelle
Anti-IE1	Maus IgG (p63-27)	unverdünnt	(Andreoni et al., 1989)
Anti-pp65	Maus IgG1 (Clonab CMV)	1:10	812600 Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)

Brückenantikörper

Bezeichnung	Isotyp	Verdünnung	Bezugsquelle
Anti-Maus IgG	Ziege IgG	1:25	M5899 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

Sekundärantikörper

Bezeichnung	Isotyp	Verdünnung	Bezugsquelle
Anti-APAAP	Maus IgG1 (AP1B9)	1:50	A7827 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

2.7.3.5 Antikörper für die Bestimmung des Virustiters über IE1-positive Zellen

Primärantikörper

Bezeichnung	Isotyp	Verdünnung	Bezugsquelle
Anti-IE1	Maus IgG (p63-27)	unverdünnt	(Andreoni et al., 1989)

Sekundärantikörper

Bezeichnung	Isotyp	Verdünnung	Bezugsquelle
Anti-Maus IgG	HRP konjugierte Kaninchen IgG	1:500	P0260 Dako (Glostrup, Dänemark)

2.7.4 Durchflusszytometrie

Die Methode der Durchflusszytometrie (FACS; *fluorescence-activated cell sorting*) ermöglicht es, die Expression von Proteinen auf Einzelzellebene zu analysieren. Durch die Emission Fluorochrom-gekoppelter, spezifischer Antikörpern können sowohl extrazelluläre Proteine, die sich auf der Oberfläche der Zellen, als auch intrazelluläre Proteine, die sich im Kern oder Zytoplasma der Zelle befinden, nachgewiesen werden. Dabei werden die Zellen durch einen Flüssigkeitsstrom geleitet und passieren einzeln den Messbereich eines Laserstrahls. Über das dabei entstehende Streulicht oder Fluoreszenzsignal, welches von einem Detektor ausgewertet wird, können Aussagen über die Größe der Zellen (FSC; *Forward Scatter*), deren Granularität (SSC; *Side Scatter*), deren Expression bestimmter Proteine oder Aussagen über die jeweiligen Zellzyklusphasen, in denen sich die Zellen befinden, getroffen werden.

2.7.4.1 Puffer und Lösungen

Click-Reaktionspuffer

100 mM TRIS-HCl; pH 8.5, 4 mM CuSO₄, 1 µM Alexa Fluor 488-Azide, 50 mM Ascorbinsäure, 0,25 mg/mL RNase A, in H₂O_{dest.}

Ribonuklease A (RNase A)

10 mg/mL Stock in 10 mM TRIS-HCl; pH 7.4, 15 mM NaCl

Citrat-Puffer

40 mM Tri-Natriumcitrat Dihydrat, 0,25 M Saccharose in H₂O_{dest.}; pH 7.4

FACS-Puffer

1% (w/v) BSA in 1xPBS

2.7.4.2 Durchführung

Um zu untersuchen, in welcher Zellzyklusphase sich CAP-Zellen unmittelbar vor Infektion befanden bzw. ob virale Proteine der sehr frühen, frühen und späten Phase der HCMV-Infektion exprimiert wurden, wurden jeweils 1,8 Mio CAP_{adh.}, HFF bzw. 10 Mio CAP_{sus.} ausgesät und bei 37°C, 5% CO₂ (260 rpm) inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde den Zellen 10 µM EdU (CAP_{adh.}, HFF) bzw. 25 µM EdU (CAP_{sus.}) zugesetzt und die Zellen anschließend für 30min bei 37°C, 5% CO₂ (80 rpm) inkubiert. Anschließend wurde das EdU-enthaltende Medium verworfen und die Zellen dreimal mit 1xPBS gewaschen. Gründliches Waschen ist notwendig, da EdU die HCMV-Infektion inhibieren kann. Daraufhin wurden die Zellen mit einer *m.o.i.* von 0,5 oder 2 infiziert und bis zur weiteren Verwendung bei 37°C, 5% CO₂ (200 rpm) inkubiert. An den gewünschten Zeitpunkten nach Infektion wurden die Zellen geerntet (siehe 2.5), mit vorgekühltem 75% (-20°C) Ethanol permeabilisiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Am Tag der Messung wurden die Zellen bei 1000 rpm in einer Megafuge 2.0 pelletiert, mit eiskaltem 1xPBS gewaschen, anschließend in 100 µL Click-Reaktionspuffer resuspendiert und für 30min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die dem Click-Reaktionspuffer zugesetzte RNase A ist für den Erfolg der Reaktion nicht ausschlaggebend. Stattdessen ist die Entfernung zellulärer RNA aus den zu messenden Proben notwendig, um eine Interkalation von Propidiumiodid (PI) in diese RNA zu verhindern. Somit werden falsch positive Ergebnisse ausgeschlossen. Während der Inkubationszeit wurden sedimentierte Zellen alle 10min resuspendiert, damit eine optimale Antikörperbindung gewährleistet werden konnte. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reaktionslösung mit 2 mL FACS-Puffer verdünnt und die Zellen durch Zentrifugation für 5min bei 1000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet anschließend in 100 µL FACS-Puffer resuspendiert, dem entweder betreffender Primärantikörper gegen das zu untersuchende virale Protein zugesetzt war oder 25µg/mL PI. Im Falle der PI-Zugabe wurden die Zellen für 5min inkubiert und die Reaktionslösung anschließend mit 2 mL FACS-Puffer verdünnt, bevor sie durch Zentrifugation für 5min bei 1000 rpm pelletiert wurden. Nach Resuspension in 500 µL 1xPBS wurden die Zellen mit Hilfe des Durchflusszytometer Cytomics FC500 untersucht. Im Falle der Zugabe spezifischer Primärantikörper wurden die Zellen zunächst für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden sie mit 2 mL FACS-Puffer gewaschen, mittels Zentrifugation pelletiert und daraufhin für eine Stunde bei 4°C im Dunkeln mit 100 µL Sekundärantikörper, verdünnt

in FACS-Puffer, inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen erneut mit 2 mL FACS-Puffer gewaschen, darauffolgend in einem Volumen von 500 μ L desselben Puffers aufgenommen und mittels Durchflusszytometer Cytomics FC500 analysiert. Für jede zu messende Probe wurde eine Negativkontrolle mitgeführt. Hierfür wurde eine Teilpopulation der zu analysierenden Zellen mit einer IgG-Isotypenkontrolle versetzt und anschließend mit dem betreffenden Sekundärantikörper inkubiert. Damit konnte die Fluoreszenz unspezifischer Bindungen ermittelt werden. Die Messung wurde mithilfe der CXP-Software von Beckman Coulter ausgewertet. Für jede Probe wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) errechnet und von dieser die mittlere Fluoreszenzintensität unspezifischer Bindungen abgezogen (Wiebusch et al., 2014).

2.7.5 Proteinkonzentrationsbestimmung

Mit Hilfe des „BCA Protein Assay“-Kits von Pierce konnte die Proteinkonzentration einer Lösung bestimmt werden. Die Reaktion beruht auf dem Farbwechsel einer Reagenzlösung, die proportional zu der Proteinkonzentration der Probe ist und anschließend photometrisch gemessen werden kann. Die Auswertung der Messung erfolgte nach Herstellerangaben und mit Hilfe einer BSA-Eichgeraden.

2.7.6 Gelelektrophorese

2.7.6.1 Puffer und Lösungen

β -Mercaptoethanol

Stock 1:1000 in *Aqua B. Braun* verdünnen; Lagerung bei -20°C

Proteinauftragspuffer (Laemmli-Puffer)

125 mM TRIS; 2% (v/v) β -Mercaptoethanol; 10% (v/v) Glycerin; 1 mM EDTA, pH 8.0; 0,005% (v/v) Bromphenolblau in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$; Lagerung bei -20°C oder 4°C

Sammelgel für SDS-PAGE

(*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

0,75 mL 1 M TRIS (pH 6.8); 1,05 mL Gel 30 (Acrylamid:Bisacrylamid-Verhältnis 37:1); 62,5 μ L 10% SDS; 62,5 μ L APS; 7,5 μ L TEMED; 4,3 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$

Trenngel für SDS-PAGE (10%)

6,25 mL 1,5 M TRIS (pH 8.8), 8,3 mL Gel 30 (Acrylamid:Bisacrylamid-Verhältnis 37:1); 250 μ L 10% SDS; 250 μ L APS; 15 μ L TEMED; 10 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$

PAGE-Puffer (5x)

192 mM Glycin, 25 mM TRIS, 0,1% SDS in H₂O_{dest.}

PAGE-Puffer (1x)

200 mL PAGE-Puffer (5x) in 800 mL H₂O_{dest.}

Protein-Molekulargewichtsstandard

PeqGOLD *Prestained* Protein Marker IV

2.7.6.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mithilfe der diskontinuierliche SDS-PAGE können Proteine anhand ihres Molekulargewichtes aufgetrennt werden (Laemmli, 1970). Das bei dieser Methode zum Einsatz kommende anionische Detergenz SDS denaturiert zum einen die Proteine; es überdeckt zudem deren Eigenladung mit einer gleichmäßig verteilten negativen Ladung. Im elektrischen Feld wandern die Proteine daher in Richtung Anode. Anhand der eingesetzten Acrylamidkonzentration kann die Maschengröße des Gels variiert werden, wobei Proteine mit einer längeren Primärstruktur im Gel stärker zurückgehalten werden, als die Proteine mit kürzerer Primärstruktur. Da die Kettenlänge der Proteine proportional zu deren Molekülmasse ist, werden die Proteine somit nach ihrer Größe aufgetrennt. Bei der diskontinuierlichen Gelelektrophorese werden die Proteine zunächst in einem Sammelgel mit neutralem pH-Wert konzentriert, bevor die Trennung mittels eines basischen Trenngels erfolgt. Sammel- und Trenngel weisen neben unterschiedlichen pH-Werten zudem auch unterschiedliche Acrylamidkonzentrationen auf. Zum Zellaufschluss und zur Reduktion von Disulfidbrücken wurden die Proben in einer Konzentration von $1 \cdot 10^5$ Zellen/10 μ L in Proteinauftragspuffer aufgenommen und für 10min bis zum Sieden erhitzt. Jeweils $1-2 \cdot 10^5$ Zellen wurden pro Probe auf das Gel aufgetragen. Um die Größen der aufgetrennten Proteine abschätzen zu können, wurde der vorgefärbte „Protein Marker IV“ von PeqLab verwendet. Die Proteine wurden anschließend über Nacht bei 4,35 V/cm (50 V, 400 mA und 100 W; Electrophoresis Power Supply-EPs 600; Pharmacia Biotech) aufgetrennt und mittels Silbernitrat angefärbt.

2.7.6.3 Bis-TRIS-PAGE

Die Bis-TRIS-PAGE ist ein weiteres System zur Auftrennung von Proteinen und wurde zur Analyse von Proteinen mittels Westernblot verwendet. Alle benötigten Materialien sowie die verwendeten 10%igen Gele wurden als Teile des Novex Bolt Gelssystems bezogen. Die Probenvorbereitung sowie die Durchführung der PAGE erfolgten wie vom

Hersteller angegeben. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert (siehe 2.7.8).

2.7.7 Silberfärbung

Die im "Roti®-Black P"-Kit mitgelieferte Silbernitratlösung ermöglicht eine Detektion von Proteinen, die zuvor mittels PAGE aufgetrennt wurden. Aufgrund der hohen Sensitivität können Proteine ab 1 ng/mM² nachgewiesen werden. Die Durchführung erfolgte dabei nach Herstellerangaben.

2.7.8 Westernblot

Die Methode des Westernblots dient dem Nachweis von Proteinen mittels Antikörpern. Im Anschluss einer PAGE werden hierfür die Proteine zunächst auf eine PVDF-Membran transferiert.

2.7.8.1 Puffer und Lösungen

Transferpuffer

25 mM TRIS-Base, 192 mM Glycin und 10% (v/v) Methanol in H₂O_{dest.}

Blocking-Reagenz

5% (w/v) Milchpulver in 1xPBS

Färbepuffer für Primäantikörper

5% (w/v) Milchpulver, 0,1% (v/v) Tween-20 in 1xPBS

Färbepuffer für Sekundäantikörper

5% (w/v) Milchpulver, 0,1% (v/v) Tween-20, 0,1% (v/v) SDS in 1xPBS

Waschpuffer

0,2% (v/v) Tween-20 in 1xPBS

2.7.8.2 Durchführung

Die Polyacrylamid-Gele wurden im Anschluss an die PAGE zunächst kurz in H₂O_{dest.} gewaschen und daraufhin für 10 bis 20min in Transferpuffer equilibriert. Zudem wurde eine auf Gelgröße zurechtgeschnittene PVDF-Membran für 5min in Methanol vorbehandelt, in H₂O_{dest.} gewaschen und daraufhin für 15min in Transferpuffer equilibriert. Das Equilibrieren dient der Entfernung von Restsalzen und verhindert somit eine

übermäßige Hitzeentwicklung während des Transfers. Für den Aufbau der Elektroblo-Apparatur wurden drei Lagen zurechtgeschnittene Whatman-Papiere in Transferpuffer getränkt und anschließend auf die Anodenplatte der Blotapparatur gelegt. Auf diese Whatman-Papiere wurde luftblasenfrei die PVDF-Membran und darauf das Gel in Beladungsorientierung gelegt. Zum Abschluss wurden erneut drei in Transferpuffer getränkte Whatman-Papiere möglichst luftblasenfrei oben aufgelegt und die Apparatur mittels Kathodenplatte verschlossen. Der Proteintransfer erfolgte für 1,5 Stunden bei 2 mA pro cm² Membran. Nach dem Transfer wurde die Membran kurz in 1xPBS gewaschen und anschließend eine Stunde in *Blocking*-Reagenz unter leichtem Schütteln inkubiert, um freie Bindungsstellen auf der Membran zu besetzen. Der Erstantikörper wurde in *Blocking*-Reagenz, welchem 0,1% (v/v) Tween-20 zugesetzt wurde, verdünnt und die Membran in dieser Lösung eingeschweißt und über Nacht unter Schütteln inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran zunächst dreimal mit Waschpuffer gewaschen und daraufhin für zwei Stunden im Dunkeln in einer Sekundärantikörper-Lösung inkubiert. Nach zwei weiteren Waschrufen mit Waschpuffer erfolgte ein dritter Waschrufen mit 1xPBS, bevor die Fluoreszenz-gekoppelten Proteine mittels „Odyssey Infrared Imager CLx“ nachgewiesen wurden. Die weitere Auswertung sowie Quantifizierung der Ergebnisse erfolgte mit der geräteinternen Software von LICOR (Image Studio Lite).

2.7.9 Indirekte Immunfluoreszenz

Die indirekte Immunfluoreszenz ist eine Methode, die den Nachweis viraler Proteine in humanen Zellen möglich macht. Hierbei werden infizierte Zellen zunächst fixiert bzw. permeabilisiert und anschließend die Bindung eines spezifischen Primärantikörpers mittels Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörpers nachgewiesen. Zunächst wurden humane Zellen auf mit Aceton vorbehandelten bzw. Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläschen ausgesät und am darauffolgenden Tag mit HCMV infiziert. Zu den gewählten Analysezeitpunkten wurden die Zellen in 90% Aceton für 20min bei Raumtemperatur fixiert und anschließend durch dreimaliges Waschen mit einer 1xPBS + 0,1% (v/v) Triton X Lösung permeabilisiert. Die Zellen wurden daraufhin mit dem spezifischen Primärantikörper, verdünnt in 1xPBS / 1% BSA, für eine Stunde bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Präparate erneut dreimal mit 1xPBS / 0,1% Triton X gewaschen und anschließend für 10min mit einer 1xPBS / 1% BSA-Lösung inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzublocken. Daraufhin wurde den Präparaten ein Fluorochrom-gekoppelter Sekundärantikörper, verdünnt in 1xPBS / 1% BSA, zugesetzt und dieser für eine Stunde bei 37°C in einer feuchten Kammer auf den Zellen belassen. Unmittelbar nach Ablauf

der Inkubationszeit wurden die Zellen mit dem Hoechst-Farbstoff DAPI, welcher selektiv Zellkerne färbt, in einer Verdünnung von 1:5000 (1xPBS / 1%BSA) versetzt und dieser für 10min im Dunkeln auf den Zellen belassen. Nach dreimaligem Waschen mit 1xPBS / 0,1% Triton X und einem weiteren Waschschriff mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ wurden die Deckgläschen in Mowiol + Bleichschutz eingebettet und über Nacht bei 37°C getrocknet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskop Axiophot von Zeiss, wobei die Ergebnisse mittels SPOT Flex Kamera FX1520 sowie der dazugehörigen Software dokumentiert wurden.

2.7.10 Zytospin

Zur Analyse der viralen Proteinexpression in CAP_{sus} wurden diese zunächst an den gewünschten Analysezeitpunkten nach Infektion geerntet (siehe 2.6.3.2) und anschließend auf Objektträger überführt. Dafür wurden $1 \cdot 10^4$ - $1 \cdot 10^5$ Zellen in 100 μL 1xPBS resuspendiert und die Lösung anschließend in die vorgesehenen Trichter der „EZ Double Cytofunnel“ Objektträgerhalterung pipettiert. Die Zellen wurden bei 800 rpm für 5min in einer „Cytospin 4“ auf die Objektträger zentrifugiert und die so entstandenen Zellspots über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen zunächst in einer -20°C kalten Mischung aus Aceton:Methanol (1:1) für 1min fixiert, die Zellspots bei Raumtemperatur für 30min getrocknet und die gewünschten Proteine anschließend über eine Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase (APAAP)-Färbung detektiert (siehe 2.7.11).

2.7.11 APAAP-Färbung

2.7.11.1 Puffer und Lösungen

10xTRIS buffered saline (10xTBS)

60,5 g TRIS, 88 g NaCl in 1L $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$, autoklavieren

1xTRIS buffered saline (1xTBS)

10xTBS 1:10 in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ verdünnen

Puffer für Antikörperverdünnungen

0,5g (w/v) BSA in 50 mL 1xTBS

2.7.11.2 Durchführung

Die vorhandenen Objektträger mit auf ihnen befindlichen, fixierten Zellen (siehe 2.7.10) wurden in TBS für 5min gewaschen und anschließend mit einer Primärantikörper-Lösung in 1xTBS / 1%BSA für 30min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach zwei Waschschritten in TBS für 5min wurden die Objektträger erneut für 30min in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur mit dem Brückenantikörper behandelt. Daraufhin wurden die Objektträger erneut zweimal für 5min mit 1xTBS gewaschen, bevor die alkalische Phosphatase-anti alkalische Phosphatase, verdünnt in 1xTBS / 1% BSA, auf die Zellspots gegeben und für 30min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer auf ihnen belassen wurde. Die Fuchsinfärbung wurde nach zwei weiteren Waschrritten der Zellspots in 1xTBS nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Zellkerne wurden mit Hilfe des Farbstoffes Hämatoxylin nach Harris (Gill II) angefärbt. Die Objektträger wurden dafür zunächst für 1min bei Raumtemperatur in einer Hämatoxylin-Lösung inkubiert und anschließenden so lange mit Wasser gespült, bis eine blau-violette Färbung der Zellspots zu beobachten war. Zum Schutz wurden die Zellspots mit 12 mm Deckgläschen und *Mounting Medium* eingedeckt.

2.7.12 Luciferase-Assay

Reportergene werden in der Zellbiologie häufig genutzt, um Genexpression oder andere zelluläre Prozesse wie Rezeptoraktivität, intrazelluläre Signaltransduktion, Proteinfaltung oder Protein-Protein Interaktionen zu untersuchen (Alam et al., 1990; Kricka et al., 1991). Der *Firefly*-Luciferase-Assay ermöglicht eine einfache und sensitive Detektion der zu untersuchenden Prozesse durch die Erzeugung von Licht mittels oxidativer Decarboxylierung von D-Luciferin zu Oxyluciferin, katalysiert durch die *Firefly*-Luciferase (de Wet et al., 1987).

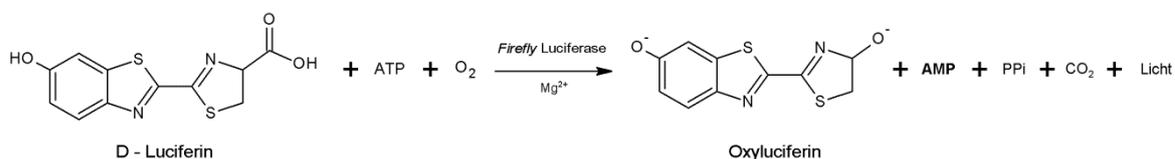


Abbildung 2: Biolumineszenz-Reaktion von Leuchtkäfern. Unter Verwendung von ATP und Sauerstoff katalysiert die *Firefly*-Luciferase die Decarboxylierung von D-Luciferin zu Oxyluciferin, wobei rotes oder gelb-grünes Licht emittiert wird.

Um zu untersuchen, ob eine Promotoraktivität in HCMV-infizierten CAP-Zellen nachgewiesen werden kann, wurden jeweils $1,5 \cdot 10^4$ / 25 μL HFF oder CAP_{adh.} in einer 96-Well Platte ausgesät und zunächst über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen entweder mit 100 μL unverdünntem

Virusüberstand oder mit 100 μL einer 1:100, 1:1000 bzw. 1:5000 Verdünnung der Viren RV-TB40/E-BAC4 Δ UL5-9 und RV-TB40/E-UL84Luc infiziert. Im Falle der CAP_{sus.} wurden $1,5 \cdot 10^4 / 25 \mu\text{L}$ Zellen unmittelbar vor Infektion in einer 96-Well Platte ausgesät. Die Luciferase-Aktivität wurde 24, 48 bzw. 96 Stunden nach Infektion mit Hilfe eines Orion II *Microplate* Luminometers bestimmt. Als Substrat diente das im „Bright-Glo Luciferase Assay System“ von Promega enthaltene D-Luciferin, wobei die Zugabe nach Herstellerangaben erfolgte. Die Auswertung erfolgte mit der vorinstallierten Hersteller-Software des Orion II *Microplate* Luminometers sowie mit Microsoft Excel.

2.8 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Methode der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) ist eine wichtige Form der Elektronenmikroskopie. Sie ermöglicht eine direkte Abbildung der zu untersuchenden Objekte mittels Elektronenstrahlen. Dabei können Objekte ab einer Größe von 0,1 nm dargestellt werden. Somit können nicht nur Bakterien, sondern auch Viren und Makromoleküle mit Hilfe dieser Methode untersucht werden. Aufgrund der starken Streuung und Absorption der Elektronen im Objekt können jedoch nur Schnitte bis zu einer Dicke von 100 nm untersucht werden (Knoll, 1932). Um die Infektion von CAP-Zellen elektronenmikroskopisch untersuchen zu können, wurden zunächst $2 \cdot 10^6$ CAP_{adh.} in 175 cm² Zellkulturflaschen ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ über Nacht inkubiert. Zudem wurden $1,8 \cdot 10^6$ HFF als Kontrolle mitgeführt. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen je nach Fragestellung mit unterschiedlichen Konzentrationen (*m.o.i.* 1, 5, 10 oder 20) an RV-TB40/E-BAC4 Δ UL5-9, RV-TowneUL130rep oder TB40/E- Δ UL16EGFP infiziert. Im Falle von CAP_{sus.} wurden $10 \cdot 10^6$ Zellen unmittelbar vor Infektion ausgesät. Sofern die Reaktion nicht nach 30 bzw. 45min oder 4h abgestoppt wurde, um frühe Zeitpunkte der Infektion zu untersuchen, wurden die Zellen 1,5 Stunden nach Infektion mit einer 0,14 M NaCl / 0,1 M Glycin (pH 3.0)-Lösung für 1min behandelt. Dadurch sollten verbliebene, nicht penetrierte Viruspartikel inaktiviert werden. Nach einem Waschschrift mit 1xPBS und Zugabe von 10 mL des jeweiligen Mediums wurden die Zellen bis zur weiteren Verwendung bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. 3 bzw. 6 Tage nach Infektion wurden die Zellen geerntet und anschließend in einer 2,5% Glutaraldehyd / 0,1 M Cacodylatpuffer / 0,1 M Saccharose-Lösung für 2 Stunden fixiert. Daraufhin wurden die Zellen jeweils dreimal mit einer 0,1 M Cacodylatpuffer / 0,1 M Saccharose-Lösung für 10min unter leichtem Schütteln gewaschen, bevor ein weiterer Fixierungsschritt mittels Osmiumtetroxid (2% OsO₄ / 0,1 M Cacodylatpuffer / 0,1 M Saccharose) für 1 Stunde erfolgte. Osmiumtetroxid kontrastiert dabei die Probe, indem die Lipide schwarz gefärbt werden. Nach drei weiteren Waschschriften mit einer 0,1 M Cacodylatpuffer / 0,1 M

Saccharose-Lösung, wurden die Zellen in warmen Agar resuspendiert und bis zur Aushärtung auf Eis gelagert. Nach drei Waschschrritten mit *Aqua B. Braun* erfolgte die schrittweise Entwässerung der Proben mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe. Daraufhin wurden die Proben zweimal für 5min mit 100% Propylenoxid inkubiert, bevor die Einbettung zunächst über Nacht in einer 1:1 Mischung aus Propylenoxid und Araldit und anschließend für 24 Stunden in purem Araldit erfolgte. Nach Polymerisation der Proben bei 65°C für 48h in einem Wärmeschrank von Labotec wurden Ultradünnschnitte angefertigt, und diese in einem Transmissionselektronen-Mikroskop der Marke Tecnai 12 Bio-Twin analysiert und mittels der Megaview III Kamera visualisiert (Graham et al., 2007; Mersseman et al., 2008a).

3. Ergebnisse

3.1 Entwicklung eines zytopathischen Effekts nach Infektion mit HCMV

Typischerweise äußert sich eine permissive HCMV-Infektion in charakteristischen Zellveränderungen, die als zytopathische Effekte (CPE; *cytophatic effect*) bezeichnet werden. Ein früher CPE geht mit einer Abrundung infizierter Fibroblasten einher, wohingegen zu späteren Zeitpunkten der Infektion granulare Einschlusskörperchen im Nukleus der infizierten Zelle beobachtet werden können (Poncet et al., 2006). In dieser Arbeit sollte daher zunächst getestet werden, ob die Infektion der CAP-Zelllinie zur Ausbildung eines CPEs führen würde. Hierfür wurden CAP_{adh.} und CAP_{sus.} mit verschiedenen HCMV-Stämmen infiziert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion mittels Phasenkontrast-Mikroskopie untersucht.

Sowohl Zellkulturen HCMV-infizierter CAP_{adh.} (Abb. 3) als auch HCMV-infizierter CAP_{sus.} (Abb. 4) zeigten ausgeprägte Zellveränderungen im mikroskopischen Bild. Bei infizierten CAP_{adh.} waren zudem die Anzeichen eines frühen CPEs klar erkennbar. Die beobachteten abgerundeten Zellen erschienen heller bzw. zeigten erhöhte Lichtbrechung. Aufgrund der zelleigenen Morphologie von CAP_{sus.} konnten hier keine Abrundungen beobachtet werden, einige der Zellen schienen jedoch vergrößert. Zudem zeichnete sich eine Tendenz zur Ausbildung von Zellhaufen ab und es wurden vermehrt nekrotische Zellen beobachtet. Die Ergebnisse zeigten, dass die HCMV-Infektion auch in CAP-Zellen zu morphologischen Veränderungen im Sinne eines CPE führt.

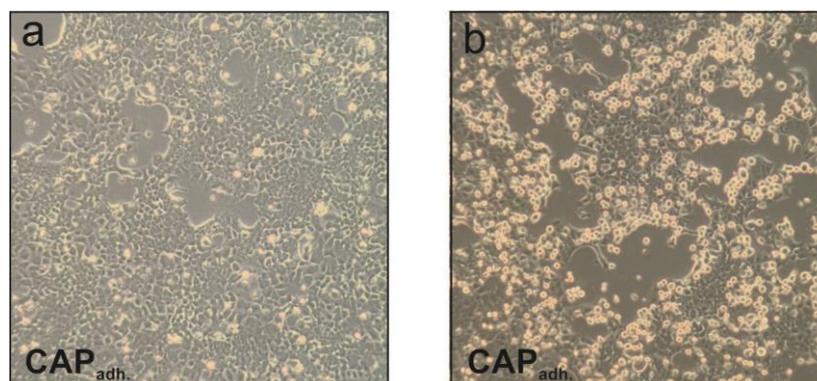


Abbildung 3: Phasenkontrast-Mikroskopie HCMV-infizierter CAP_{adh.}. (a), Nicht infizierte CAP_{adh.}, 3 Tage nach Passagierung. (b), Infizierte CAP_{adh.}, 2 Tage nach Infektion mit Stamm RV-TowneUL130rep, *m.o.i.* 2,5.

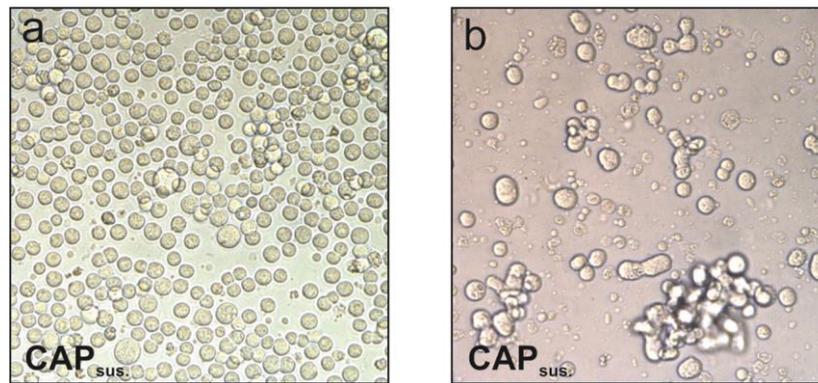


Abbildung 4: Phasenkontrast-Mikroskopie HCMV-infizierter CAP_{sus.} (a), Nicht infizierte CAP_{sus.}, 5 Tage nach Passagierung. (b), Infizierte CAP_{sus.}, 6 Tage nach RV-TB40/E-UL84Luc-Infektion, *m.o.i.* 5.

3.2 Penetration von HCMV in CAP-Zellen

Adsorption an und Penetration in die Zielzelle sind die ersten, entscheidenden Schritte einer Virusinfektion. Obwohl die Entwicklung von zytopathogenen Veränderungen nahelegte, dass HCMV in CAP-Zellen eindringen kann, konnte dies zunächst nicht als formaler Beweis gewertet werden. Im Folgenden sollte ein solcher Beweis geführt werden.

3.2.1 Nachweis der HCMV-Infektion von CAP-Zellen durch Luciferase-Expression

Die HCMV-Mutante RV-TB40/E-BAC4 Δ UL5-9 exprimiert das Gen für die Luciferase des Glühwürmchens (*Firefly-Luciferase*) unter Kontrolle des SV40 *Early*-Promotors. Eine Expression der Luciferase nach Infektion von Kulturzellen mit diesem Virus ist daher beweisend für eine erfolgreiche Adsorption und Penetration.

CAP_{adh.} bzw. CAP_{sus.} wurden, wie in 2.7.12 beschrieben, ausgesät und anschließend mit RV-TB40/E-BAC4 Δ UL5-9 mit einer *m.o.i.* von 5 infiziert. 1, 2 und 4 Tage nach Infektion wurde den Zellkulturen das Substrat Luciferin zugesetzt und die Luciferase-Aktivität im Lysat der infizierten Zellkulturen gemessen. Sowohl in CAP_{adh.} als auch in CAP_{sus.} konnte Luciferase-Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 5). Im Falle der CAP_{sus.} war diese im direkten Vergleich mit CAP_{adh.} initial höher (1d p.i.), nahm aber im Laufe der Infektionsdauer zunächst nur schwach zu, um dann zu späten Zeitpunkten der Infektion stark abzufallen (4d p.i.). Im Gegensatz dazu war der Anstieg der Luciferase-Aktivität in CAP_{adh.} deutlicher zu erkennen. Zudem konnte zu späten Zeitpunkten der Infektion nur ein schwacher Abfall der Aktivität beobachtet werden. Zusammengefasst zeigten diese

Ergebnisse, dass HCMV CAP-Zellen infizieren kann, dass die virale DNA in den Zellkern transportiert wird und dass die Genexpression vom viralen Genom initiiert wird.

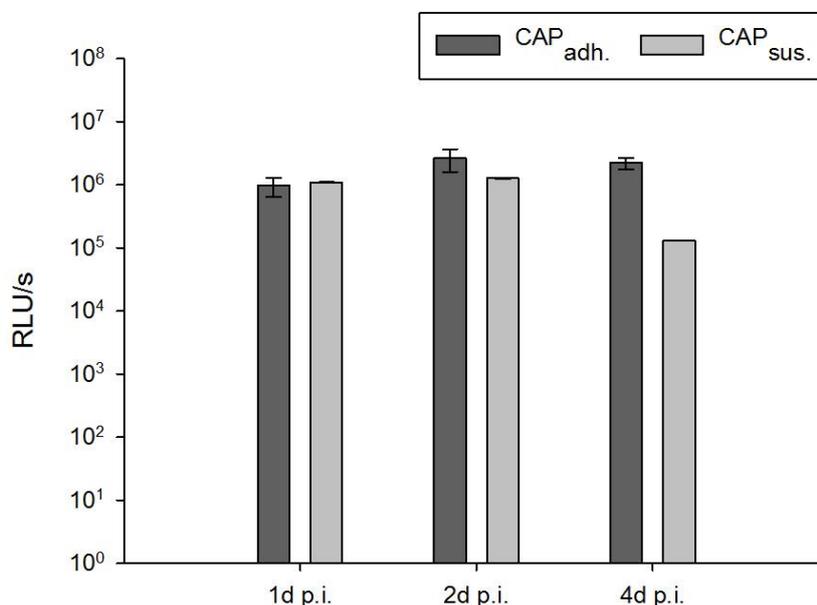


Abbildung 5: Luciferase-Assay von RV-TB40/E-BAC4 Δ UL5-9-infizierten CAP_{adh.} und CAP_{sus.}. CAP-Zellen wurden in 96-Well Platten ausgesät. Infektion mit RV-TB40/E-BAC4 Δ UL5-9 mit einer *m.o.i.* von 5 erfolgte im Falle von CAP_{adh.} am Folgetag, CAP_{sus.} wurden unmittelbar nach Aussaat infiziert. Die Luciferase-Aktivität wurde zu angegebenen Zeitpunkten nach Infektion bestimmt. Die Fehlerbalken ergeben sich aus der Mittelwertabweichung von vier technischen Replikaten.

3.2.2 Analyse der initialen Infektionsereignisse durch Transmissionselektronenmikroskopie

Die initialen Ereignisse von CAP-Zellen nach HCMV-Infektion sollten, aufbauend auf den vorangegangenen Analysen, mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) untersucht werden. CAP_{adh.} und CAP_{sus.} wurden mit RV-TowneUL130rep mit einer *m.o.i.* von 5 (Abb. 6b, c, d) oder mit RV-TB40/E- Δ UL16EGFP mit einer *m.o.i.* von 20 (Abb. 6a) infiziert und 30min bzw. 4h nach Infektion mit einer 2,5% Glutaraldehyd / 0,1 M Cacodylatpuffer / 0,1 M Saccharose-Lösung für 2 Stunden fixiert (siehe 2.8). Daraufaufgehend wurden Ultradünnschnitte angefertigt und mit Hilfe eines Transmissionselektronenmikroskops untersucht. In CAP_{adh.} konnten bereits nach 30min mehrere vesikuläre Strukturen im Zytoplasma der infizierten Zelle beobachtet werden. Einige dieser Vesikel enthielten Strukturen, bei denen es sich wahrscheinlich um abgebautes zelluläres bzw. virales Material handelte; jedoch waren auch Vesikel zu sehen, die umhüllte Virionen enthielten (Abb. 6a). Bei Infektion mit der HCMV-Mutante RV-TowneUL130rep, die neben infektiösen Virionen hohe Konzentrationen an DBs

produziert, konnten diese subviralen Partikel sowohl in Vesikeln als auch frei vorliegend im Zytoplasma der infizierten Zelle gefunden werden (Abb. 6b). Die Beobachtungen legen nahe, dass eine Penetration von HCMV in CAP_{adh.} sowohl durch Rezeptorvermittelte Endozytose als auch über Membranfusion möglich ist. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen von CAP_{sus.} konnten ebenfalls Virionen-ähnliche Strukturen im Zytoplasma beobachtet werden (Abb. 6c, d). Interessanterweise waren hier jedoch trotz der Infektion mit RV-TowneUL130rep keine DBs zu finden. Im direkten Vergleich mit den Aufnahmen von CAP_{adh.} konnten keine vesikulären Strukturen gefunden werden. Die viralen Partikel lagen frei im Zytoplasma vor. Dieser Umstand lässt darauf schließen, dass die Penetration in CAP_{sus.} vorwiegend über Membranfusion an der Zelloberfläche erfolgte. Die Partikel sahen darüber hinaus deformiert aus. Es ist daher unklar, ob es sich dabei in der Tat um infektiöse Virionen handelte oder ob hier partikuläre Strukturen detektiert wurden, die nicht zum Zellkern gelangten und von der Zelle abgebaut wurden.

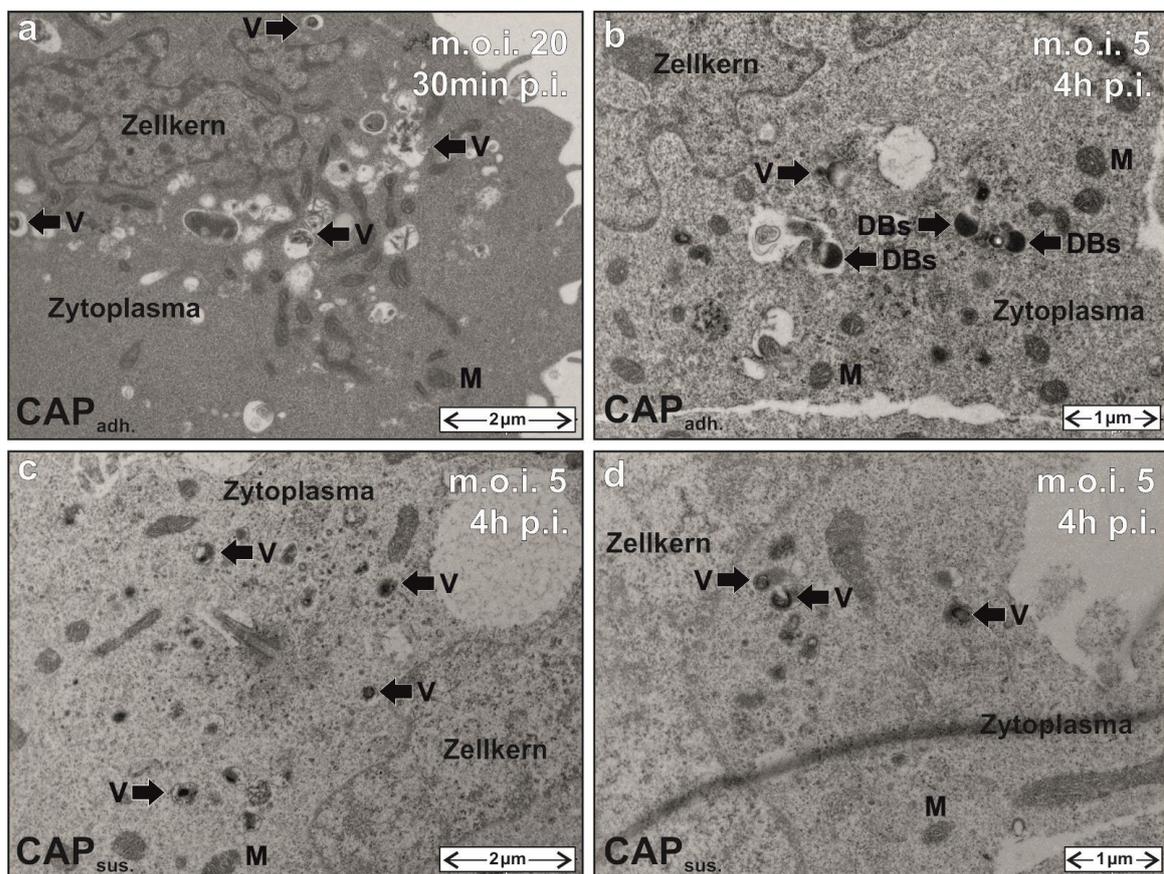


Abbildung 6: TEM von HCMV-infizierten CAP_{adh.} und CAP_{sus.} zu frühen Zeitpunkten der Infektion. CAP_{adh.} bzw. CAP_{sus.} wurden entweder mit RV-TB40/E- Δ UL16EGFP mit einer *m.o.i.* von 20 (a) oder mit RV-TowneUL130rep mit einer *m.o.i.* von 5 infiziert (b, c, d). 30min (a) oder 4h (b, c, d) nach Infektion wurden die Zellen für die Auswertung vorbereitet und anschließend mittels TEM untersucht (siehe 2.8). V, Virionen. DBs, Dense Bodies. M, Mitochondrium.

3.2.3 Analyse der Infektionseffizienz von CAP_{adh.} mit HCMV-Laborstämmen

Laborstämme des HCMV zeigen im Vergleich zu Wild-Typ Isolaten in Kultur ein stark eingeschränktes Wirtszellspektrum. Hierbei nutzen Laborstämme zur Infektion bevorzugt die Membranfusion an der Zelloberfläche. Die Vermutung, dass eine Penetration von CAP-Zellen auch über Membranfusion möglich ist sollte daher im Folgenden unter Verwendung der Laborstämme AD169 (RV-HB5) und Towne (RV-Towne-BAC) bestätigt werden.

CAP_{adh.} wurden mit diesen Stämmen mit einer *m.o.i.* von 1 infiziert und 2 Tage nach Infektion einer indirekten Immunfluoreszenzanalyse unterzogen. Hierzu wurde ein monoklonaler Antikörper (mAK) gegen das virale IE1-Protein eingesetzt. In der Tat konnte in einer erheblichen Anzahl der untersuchten Zellen die Expression von IE1 nachgewiesen werden (Abb. 7) Dieses Resultat deutete darauf hin, dass CAP-Zellen über Membranfusion an der Zelloberfläche mit HCMV infizierbar sind. Aufbauend auf diese Ergebnisse sollte die Effizienz der Infektion ermittelt werden. Dafür wurden CAP_{adh.} und HFF (Kontrolle) mit jeweils 500 μ L unverdünnter Virusüberstände beider Laborstämme infiziert. 6h nach Infektion wurden die Zellen geerntet. Lysate dieser Zellen wurden mit Hilfe der qPCR (siehe 2.7.1.1 und 2.7.2.1) auf Aufnahme viraler Genome in die Zelle hin untersucht. Es zeigte sich, dass in HFF die Aufnahme viraler Genome als Marker für Infektionseffizienz erwartungsgemäß hoch war. In CAP_{adh.} fanden sich, im Vergleich zur HFF-Kontrolle, 29% (RV-HB5) bzw. 5,7% (RV-Towne-BAC) der viralen Genome. Diese Ergebnisse zeigten, dass CAP-Zellen, wenn auch moderat, mit Laborstämmen des HCMV infizierbar sind. Dies war überraschend und steht im Gegensatz zu Endothel- bzw. Epithelzellkulturen, die resistent gegenüber einer Infektion mit HCMV-Laborstämme sind (Wang et al., 2005a; Sinzger et al., 2008a).

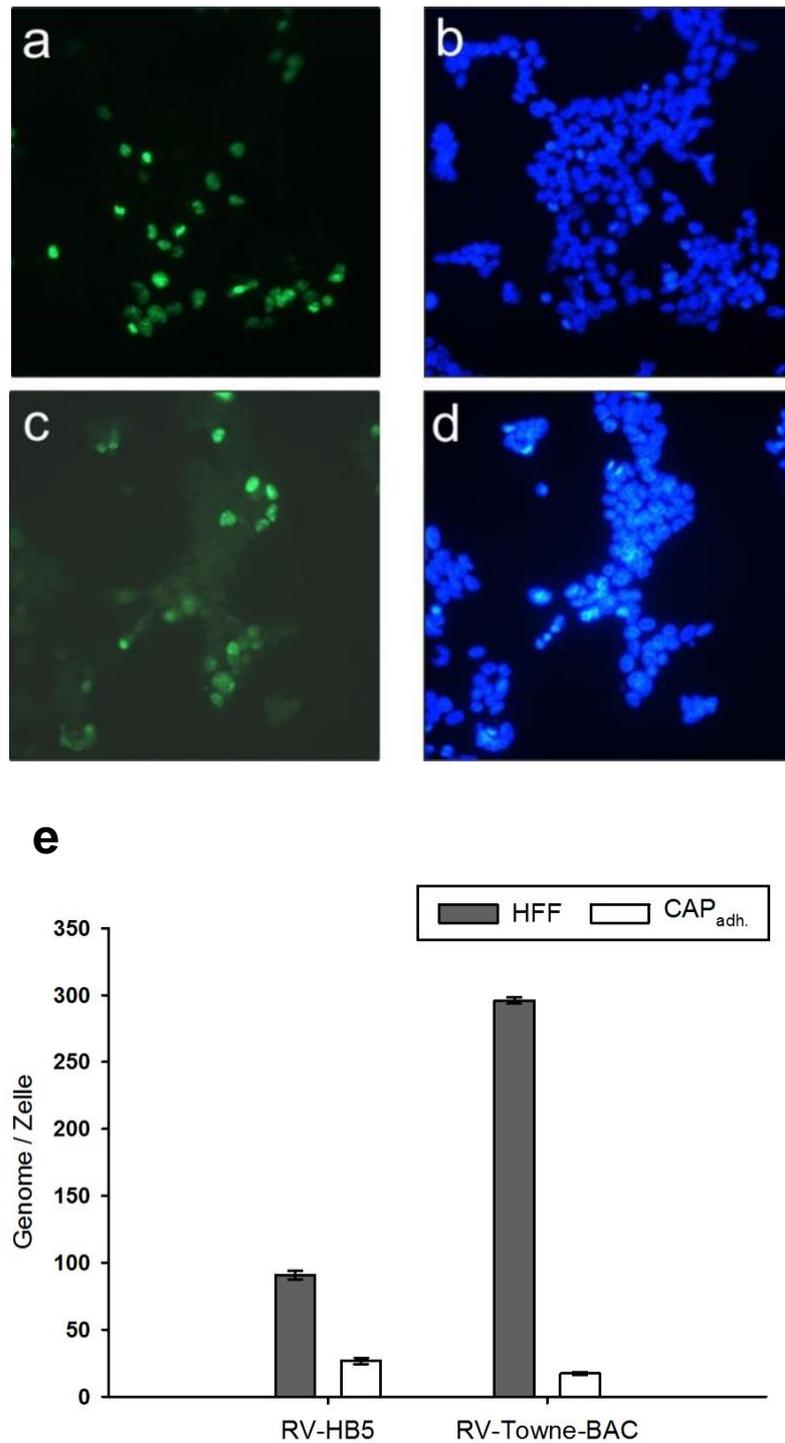


Abbildung 7: Immunfluoreszenzanalyse der viralen Genexpression und qPCR-Analyse der viralen Genomaufnahme nach Infektion von CAP_{adh.} mit HCMV-Laborstämmen. CAP_{adh.} wurden entweder mit RV-Towne-BAC (a, b) oder RV-HB5 (c, d) mit einer *m.o.i.* von 1 infiziert. 2 Tage nach Infektion wurden die Zellen geerntet und mit einem IE1-spezifischen mAK angefärbt (p63-27; a, c). Die Kerne der Zellen wurden mit dem Farbstoff DAPI sichtbar gemacht (b, d). Die Aufnahmeeffizienz viraler Genome in CAP_{adh.} nach Infektion mit HB5 bzw. Towne wurde mit Hilfe der qPCR ermittelt (e). Die Aufnahme viraler Genome in HFF wurde als Kontrolle mitgeführt. Die Fehlerbalken ergeben sich aus der Mittelwertabweichung von drei technischen Replikaten.

3.3 Freisetzung von Nachkommen-Viren nach Infektion mit HCMV

Für eine produktive Infektion, die mit der Freisetzung infektiöser Nachkommen-Viren einhergeht, muss die Wirtszelle gleichzeitig suszeptibel sowie permissiv sein. In diesem Zusammenhang bedeutet suszeptibel, dass das Virus in der Lage ist, an spezifische Rezeptoren der Wirtszelle zu binden und diese anschließend zu penetrieren. Permissive Zellen wiederum unterstützen die virale DNA-Replikation. HCMV ist hier in der Lage, den zellulären Abwehrmechanismen der Wirtszelle zu entgehen. Infektionen suszeptibler aber nicht permissiver Zellen liefern keine infektiösen Nachkommen-Viren und werden abortive Infektionen genannt. Auch Infektionen, bei denen nicht das komplette Repertoire der viralen Gene, die für die Virusreplikation notwendig sind, transkribiert bzw. in funktionelle Produkte übersetzt wird, werden abortiv genannt. Infektionen, in denen das Virus in der Wirtszelle persistiert oder in denen nur wenige Zellen der infizierten Zellkultur infektiöse Nachkommen produzieren, werden restriktiv genannt (Roizman, 1996). Die Verwendung von CAP-Zellen als Zellsubstrat für die Produktion von *Dense Bodies* setzt eine permissive Infektion von HCMV voraus. Es sollte an dieser Stelle die Frage geklärt werden, ob CAP-Zellen in der Lage sind, infektiöse Nachkommen-Viren freizusetzen.

3.3.1 Qualitativer Nachweis der Virusfreisetzung aus CAP_{adh.}

Hierfür wurden in einem ersten Versuchsansatz CAP_{adh.} zunächst mit der GFP-exprimierenden Mutante RV-TB40/E- Δ UL16EGFP mit einer *m.o.i.* von 5 infiziert. 4 und 7 Tage nach Infektion wurden die Überstände der infizierten Zellkulturen gesammelt. Jeweils 1mL davon wurde auf HFF-Kulturen transferiert (Abb. 8a). Die Infektion wurde daraufhin mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops untersucht. Die Freisetzung von infektiösen Viren aus CAP_{adh.} konnte anhand beider getesteter Überstände sowohl nach 4- wie auch nach 7-tägiger Infektion nachgewiesen werden (Abb. 8b, c). 6d nach Transfer der Überstände auf HFF war die Ausbreitung der Infektion in den HFF-Kulturen, die mit Virusüberständen aus 7 Tage infizierten CAP_{adh.} versetzt wurden, zudem wesentlich ausgeprägter (Abb. 8c) als die, die mit aus 4 Tagen infizierten CAP_{adh.} gesammelten Virusüberständen infiziert worden waren (Abb. 8a). Dies legte eine Akkumulation infektiöser Partikel in Abhängigkeit von der Zeit nach Infektion nahe. Die Ergebnisse zeigten, dass CAP_{adh.} permissiv gegenüber einer HCMV-Infektion sind.

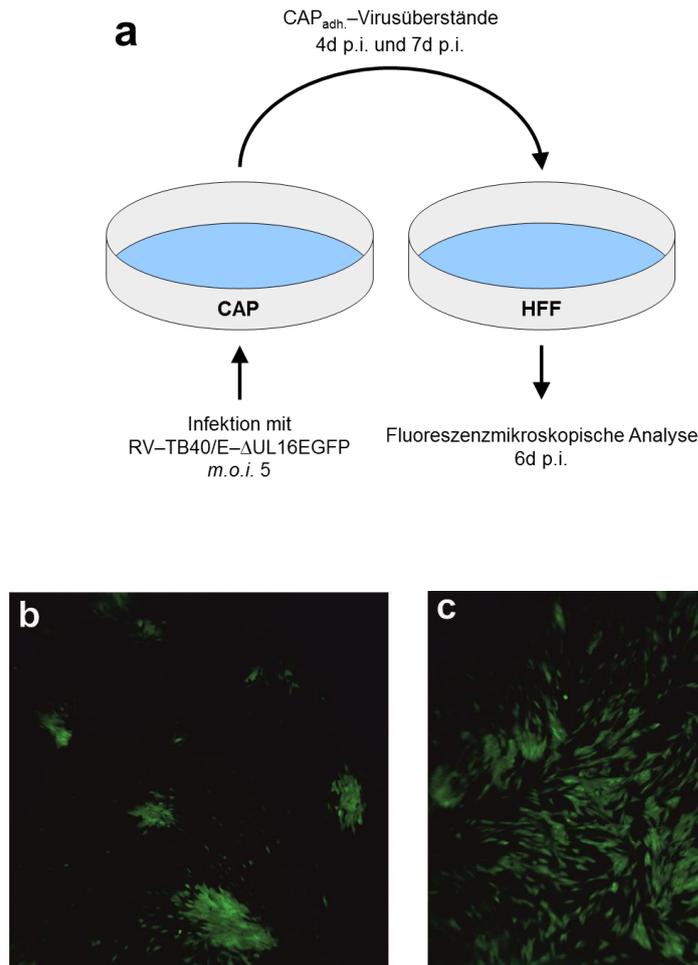


Abbildung 8: Qualitativer Nachweis der Virusfreisetzung in Zellkulturüberständen von 4 Tage und 7 Tage infizierten CAP_{adh.}. CAP_{adh.} wurden mit RV-TB40/E-ΔUL16EGFP, *m.o.i.* 5 infiziert und 4d p.i. bzw. 7d p.i. die jeweiligen Zellkulturüberstände geerntet. 1mL dieser Virusüberstände wurde für die Infektion von HFF verwendet. 6d p.i. wurden die Infekte mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht und die Ergebnisse dokumentiert (a). (b), HFF, die mit Virusüberständen aus 4d infizierten CAP_{adh.} inkubiert wurden. (c) HFF, die mit Virusüberständen aus 7d infizierten CAP_{adh.} inkubiert wurden.

3.3.2 Quantitative Analyse der Virus-Genomfreisetzung aus CAP-Zellen mit Hilfe der qPCR

Zur quantitativen Analyse der HCMV-Freisetzung aus CAP-Zellen wurde zunächst der Gehalt viraler Genome im Kulturüberstand infizierter Zellen mittels qPCR ermittelt. Dafür wurden CAP_{adh.} und CAP_{sus.} mit RV-TowneUL130rep mit einer *m.o.i.* von 2,5 infiziert. Nach Ablauf der eineinhalbstündigen Inkubationszeit wurde der virushaltige Überstand gesammelt. Dieser Überstand wurde zur Ermittlung des Basiswerts verwendet (0d p.i.). Anschließend wurde den Zellen 0,14 M NaCl / 0,1 M Glycin (pH 3.0)-Lösung für 1min zugesetzt. Dadurch sollten an der Zelloberfläche verbliebene Viren inaktiviert werden (siehe 2.6.3.3). Nachfolgend wurde mit 1xPBS gewaschen und den Zellen anschließend

jeweiliges Medium in geeignetem Volumen zugegeben (siehe 2.6.3.1 und 2.6.3.2). Um falsch positive Ergebnisse durch Messung viraler *Input*-DNA auszuschließen, wurden die Zellkulturen zudem entweder mit oder ohne Zugabe von 0,25 mg/mL Phosphonoessigsäure (PAA) inkubiert. PAA inhibiert spezifisch die Replikation von HCMV durch Hemmung der viralen DNA-Polymerase (Huang, 1975). 2d, 4d und 6d nach Infektion wurden die Virusüberstände der jeweiligen infizierten Zellkultur gesammelt, die virale DNA extrahiert (siehe 2.7.1.1) und mittels qPCR analysiert (siehe 2.7.2.1). Die Ergebnisse wurden in Genome/mL berechnet.

Für CAP_{adh.} konnte eine eindeutige Freisetzung viraler Genome über den Beobachtungszeitraum hinweg nachgewiesen werden (Abb. 9a). Diese Freisetzung war PAA sensitiv, da wesentlich weniger virale Genome in den mit PAA versetzten Proben gemessen werden konnten. Dies sprach dafür, dass es sich bei der freigesetzten viralen DNA aus CAP_{adh.}, denen kein PAA zugesetzt wurde, um DNA neu synthetisierter Partikel handelte. In den Kulturüberständen aus infizierten CAP_{adh.} wurden jedoch etwa 10-fach weniger virale Genome gefunden als in den Überständen aus HFF. Dies deutete darauf hin, dass CAP_{adh.} deutlich weniger Viren freisetzen als die Kontrollzellen.

Im Falle der Freisetzungskinetik von CAP_{sus.} fiel zunächst auf, dass sich im Virusüberstand dieser Zellen initial mehr virale Genome befanden als im Überstand infizierter HFF (Abb. 9b). Dies bestätigte sich auch in Proben, die nach 2d nach Infektion gewonnen worden waren. Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass die Aufnahme viraler Genome durch CAP_{sus.} weniger effizient war als die Aufnahme durch HFF, somit mehr *Input*-Genome im Überstand verblieben. Zu späteren Infektionszeitpunkten konnte keine Genomfreisetzung aus CAP_{sus.} beobachtet werden. Weder unterschieden sich die Mengen an freigesetzter, viraler DNA in den Proben mit und ohne Zugabe von PAA, noch stieg die detektierte Menge der viralen Genome im Laufe der Infektion über den Wert, der 2d p.i. gemessen wurde. Im Falle der HFF war dagegen ein klarer Anstieg der freigesetzten Menge an viraler DNA zu beobachten. Dieser Umstand sprach gegen mögliche Fehler im Versuchsablauf oder bei der Messung. Wahrscheinlicher war, dass es sich bei den im Virusüberstand von CAP_{sus.} detektierten Mengen um *Input*-DNA handelte. Die Resultate legten den Schluss nahe, dass CAP_{sus.} die Replikation viraler DNA bzw. die Produktion infektiöser Nachkommen-Viren nur sehr ineffizient oder gar nicht unterstützten. Worin der limitierende Faktor lag, der eine effiziente Freisetzung viraler DNA in CAP_{adh.} möglich machte, in CAP_{sus.} hingegen nicht, war zu diesem Zeitpunkt unklar.

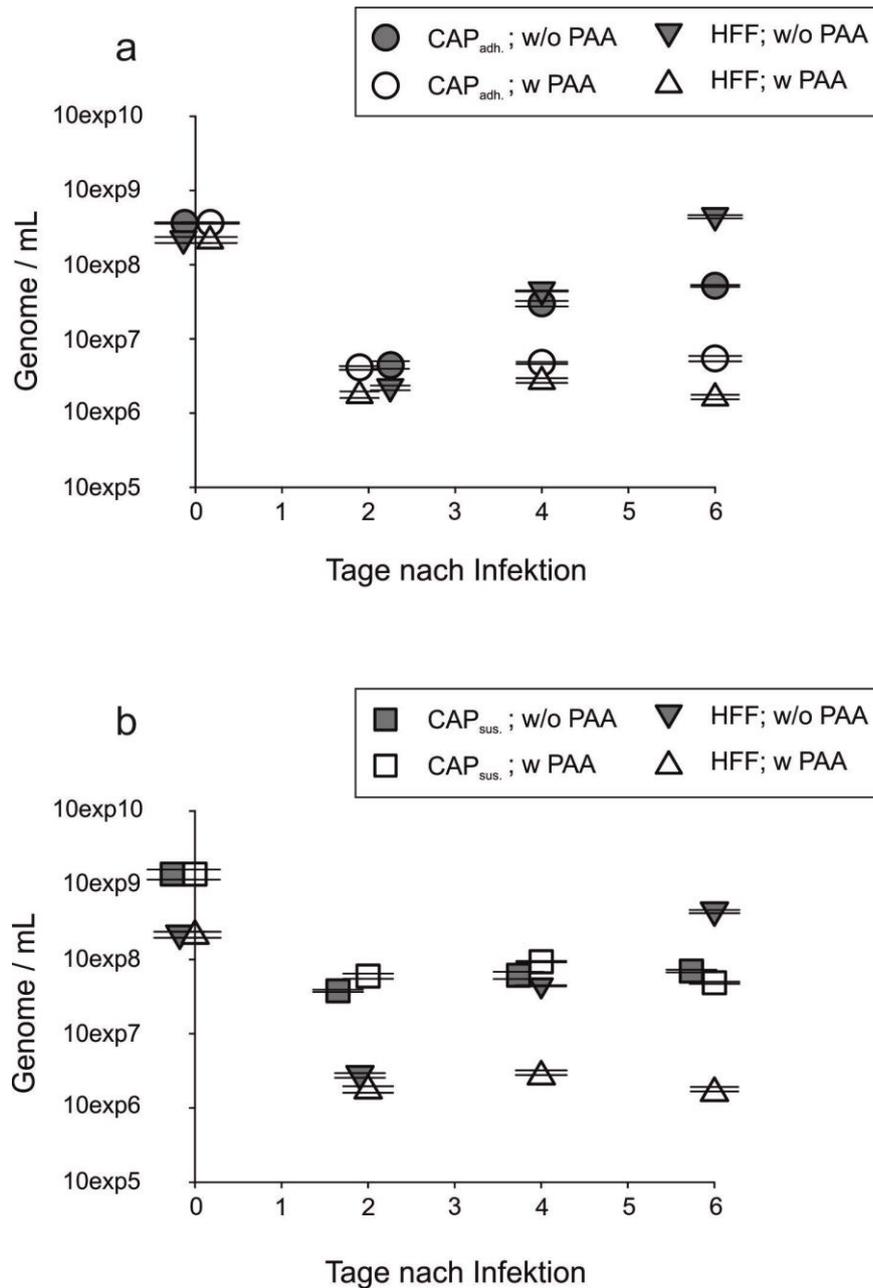


Abbildung 9: Messung viraler Genomfreisetzung in den Zellkulturüberstand 2d, 4d und 6d infizierter CAP-Zellen mittels qPCR. CAP_{adh.} (a) und CAP_{sus.} (b) wurden mit RV-TowneUL130rep *m.o.i* 2,5 infiziert. 1,5h nach Infektion wurden die Zellen mit einer Lösung aus 0,14 M NaCl / 0,1 M Glycin (pH 3.0) für 1min inkubiert und anschließend mit 1xPBS gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen mit Medium versetzt, dem entweder 0,25 mg/mL oder kein PAA zugesetzt wurde. 2d p.i., 4d p.i. und 6d p.i. wurde die Virusüberstände gesammelt, die virale DNA isoliert und deren Menge mittels qPCR analysiert. Die Fehlerbalken ergeben sich aus der Mittelwertabweichung von drei technischen Replikaten.

3.3.3 Virustitration der aus CAP_{adh.} freigesetzten Virionen zu späten Zeitpunkten der Infektion

Der Nachweis viraler Genome im Überstand infizierter CAP_{adh.} legten nahe, dass diese Zellen in der Tat eine erhebliche Anzahl von Virusnachkommen freisetzen. Ein schlussendlicher Beweis, dass der Nachweis viraler DNA auch mit der Freisetzung infektiöser Virionen korrelierte stand jedoch noch aus. Daher wurden CAP_{adh.} zunächst mit RV-TB40/E- Δ UL16EGFP mit einer *m.o.i.* von 10 infiziert. Einen Tag nach Infektion wurde ein kompletter Mediumwechsel vorgenommen, um die im Zellkulturüberstand verbliebenen Viren zu entfernen. (siehe 2.6.3.1). 6, 8, 10 und 13 Tage nach Infektion wurden die Zellkulturüberstände geerntet. Die Titer an infektiösen Viren wurden in der Folge auf HFF-Kulturen mittels quantitativer Analyse IE1-positiver Zellen bestimmt (siehe 2.6.5).

Die Ergebnisse bestätigten, dass in CAP_{adh.} infektiöse Virionen gebildet und anschließend freigesetzt wurden (Abb. 10a). Im Verlauf der Infektion stiegen die Virustiter wie erwartet an und erreichten ihr Maximum 10 Tage nach Infektion. Zu späteren Infektionszeitpunkten wurde ein Abfall der Anzahl IE1-positiver HFF sichtbar. Dies ist wahrscheinlich mit dem verstärkten Zelluntergang zu späten Zeitpunkten der Infektion zu erklären. Ein Anstieg bzw. Maximum freigesetzter Partikel 6 und 10 Tage nach Infektion konnte auch bei Virustitrationen beobachtet werden, die mit Virusüberständen aus infizierten HFF durchgeführt wurden (Abb. 10b). Allerdings wurde hier im Vergleich zur Freisetzung aus CAP_{adh.} ein tausendfach höherer Virustiter detektiert. Die Ursache für diese Limitation in CAP_{adh.} war unklar und sollte in weiteren Experimenten untersucht werden.

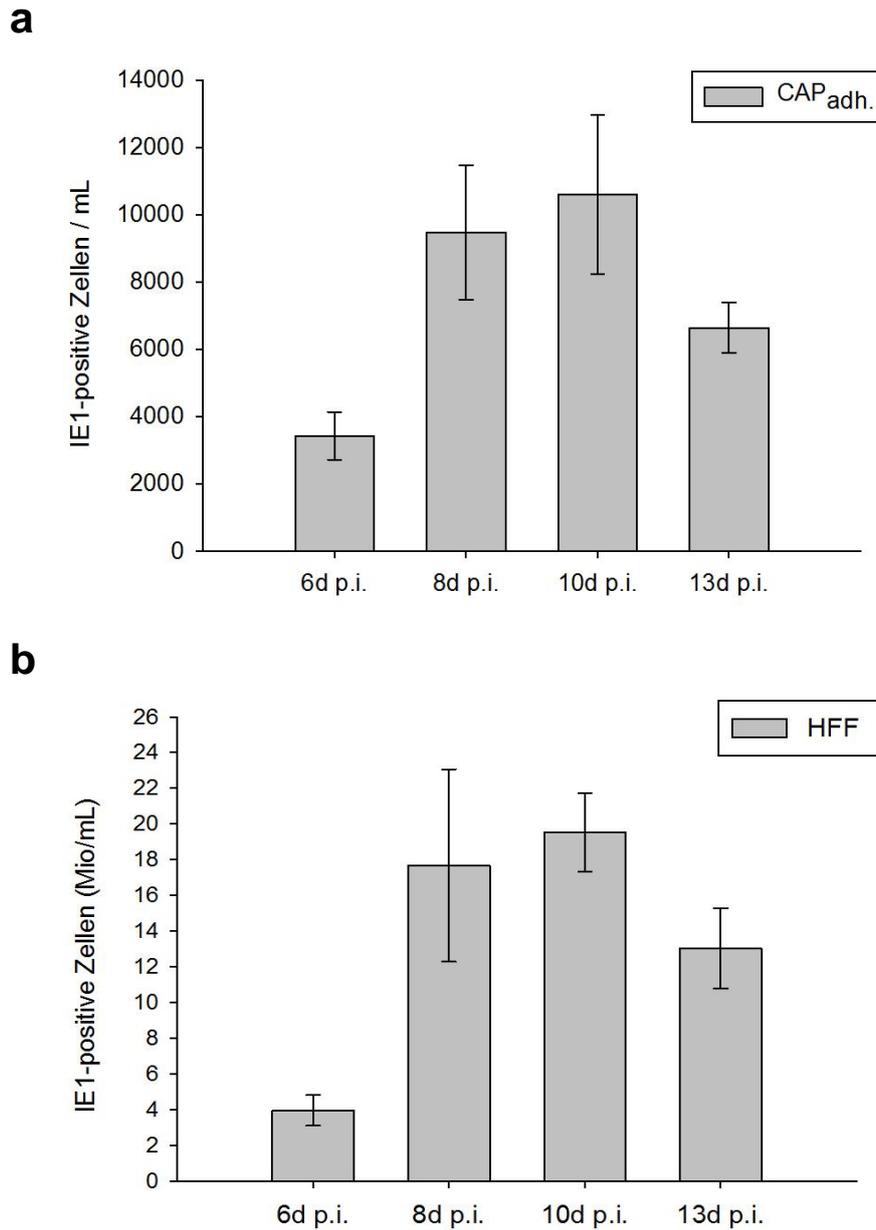


Abbildung 10: Analyse der Freisetzung infektiöser Viren in den Zellkulturüberstand infizierter CAP_{adh.} und HFF. Virusüberstände von RV-TB40/E- Δ UL16EGFP infizierten CAP_{adh.} (**a**; *m.o.i.*10) und HFF (**b**; *m.o.i.*1) wurden 6d p.i., 8d p.i., 10d p.i. und 13d p.i. gesammelt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die Infektiosität der Virusüberstände wurde anhand der Färbung IE1-positiver HFF ermittelt. Jeder Virusüberstand wurde in 8 biologischen Replikaten getestet. Die Fehlerbalken wurden aus der Mittelwertabweichung der Ergebnisse dieser Replikate ermittelt.

3.4 Analyse der initialen Ereignisse in CAP-Zellen nach HCMV-Infektion

3.4.1 Analyse der IE1-Expression HCMV-infizierter CAP_{adh.} und CAP_{sus.}

Die Expression der *immediate-early* Gene ist eine Voraussetzung für die Initiation des Replikationszyklus von HCMV. Ein Schlüsselmolekül ist hierbei IE1. Die bis zu diesem Punkt erhaltenen Ergebnisse zeigten, dass IE1-Expression nach HCMV-Infektion von CAP-Zellen erfolgen musste. In diesem Abschnitt sollte nun die Infizierbarkeit der Zellen anhand der IE1-Expression näher untersucht werden. Zur Analyse der IE1-Proteinsynthese in CAP-Zellen wurden CAP_{adh.} mit RV-TB40/E-BAC7 mit einer *m.o.i.* von 1 oder CAP_{sus.} mit RV-TowneUL130rep mit einer *m.o.i.* von 0,5 infiziert.

Einen Tag nach Infektion wurde die IE1-Expression in CAP_{adh.} durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung (siehe 2.7.9), in CAP_{sus.} durch APPAP-Färbung detektiert (siehe 2.7.10 und 2.7.11). Grün-fluoreszierende (CAP_{adh.}) bzw. rot-gefärbte (CAP_{sus.}) Zellen zeigten eine spezifische Färbung des viralen Proteins IE1 an. IE1-Expression konnte in ca. 80% der CAP_{adh.} beobachtet werden (Abb. 11a, b). In CAP_{sus.} konnte IE1 sogar in nahezu allen Zellen nachgewiesen werden (Abb. 11c, d). Da hier zudem mit einer geringeren Infektionsstärke infiziert wurde, lag nahe, dass CAP_{sus.} im Vergleich zu CAP_{adh.} effizienter mit HCMV infizierbar waren. Zusammengefasst zeigten diese Analysen, dass beide Kulturen Viruspenetration und initiale Genexpression überraschend effizient unterstützen.

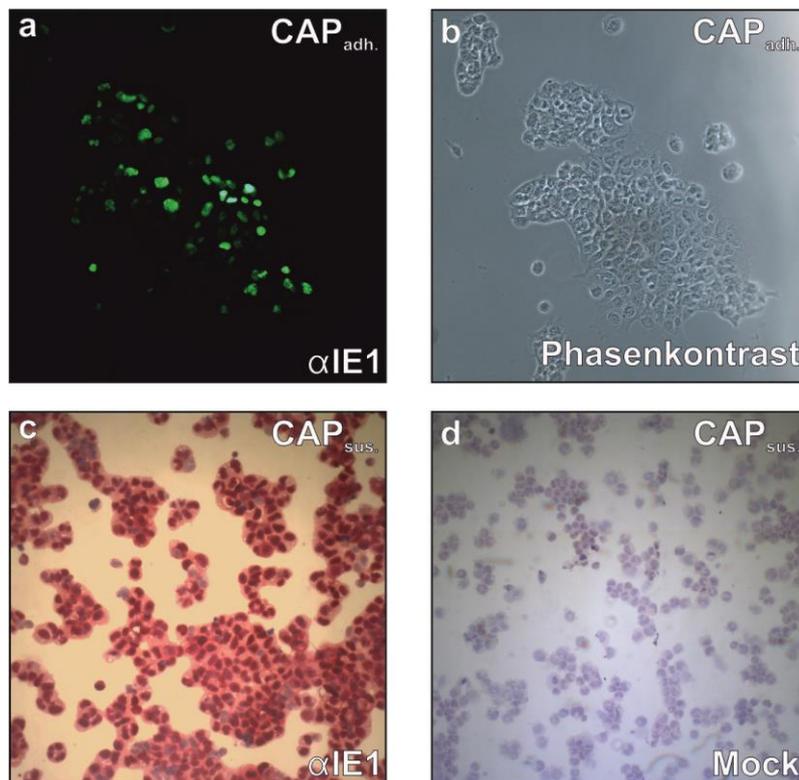


Abbildung 11: Analyse der Viruspenetration und IE1-Expression in HCMV-infizierten CAP-Zellen. CAP_{adh.} wurden mit RV-TB40/E-BAC7 mit einer *m.o.i.* von 1 infiziert. Die IE1-Expression wurde einen Tag nach Infektion mittels indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen (a). (b), korrespondierende Phasenkontrast-Aufnahme. CAP_{sus.} wurden mit RV-TowneUL130rep mit einer *m.o.i.* von 0,5 infiziert. Einen Tag nach Infektion wurden Zytospin-Präparate angefertigt und die IE1-Expression mittels APAAP-Färbung nachgewiesen (c). (d), analog behandelte, nicht infizierte Zellen.

3.4.2 Analyse der Auflösung zellulärer ND10-Domänen in HCMV infizierten CAP_{adh.}

Das Stummschalten viraler Genome durch Bindung hemmender Chromatin-Strukturen an die virale DNA ist einer der multiplen, zellulären Abwehrmechanismen, die gegen eindringende Viren zum Einsatz kommen und letztendlich die virale Genexpression verhindern. Dieser Vorgang wird durch zelluläre Proteine vermittelt, die in spezifischen nukleären Strukturen zusammengelagert sind und auch als *nuclear domain 10* (ND10) oder als *Promyelocytic leukemia protein* (PML) *bodies* bekannt sind (Woodhall et al., 2006; Everett et al., 2007; Tavalai et al., 2009). Eine der diversen, von HCMV entwickelten immunevasiven Strategien, die notwendig sind, um die Replikation der viralen DNA zu ermöglichen, ist es, die Anlagerung repressiver Histone an virale Promotoren zu verhindern. Dies wird unter anderem durch die Auflösung zellulärer ND10-Domänen durch IE1-vermittelte DeSUMOylierung des Gerüstproteins PML bewirkt (Korioth et al., 1996; Ahn et al., 1997; Ahn et al., 1998; Wilkinson et al., 1998; Lee et al., 2004; Saffert et al., 2006).

Im Folgenden sollte getestet werden, ob ND10-Domänen, ähnlich wie nach HCMV Infektion von HFF auch in CAP-Zellen aufgelöst werden. Zur besseren Darstellung zellulärer Strukturen wurden diese Experimente mit CAP_{adh.} durchgeführt. CAP_{adh.} und HFF (Kontrolle) wurden zunächst mit RV-TB40/E-BAC7 mit einer *m.o.i.* von 2 infiziert. 3h, 5h bzw. 24h nach Infektion wurden die Zellen einer indirekten Immunfluoreszenzanalyse mit spezifischen Antikörpern gegen IE1 und PML unterzogen. Um die gleichzeitige Detektion beider Antigene zu gewährleisten, wurde für IE1 ein muriner, mAK verwendet, für PML dagegen ein spezifisches Antiserum aus dem Kaninchen. Zur Färbung wurden die Zellen mit den Sekundärantikörpern anti-Maus Alexa Fluor 488 zur Detektion von IE1 (grün; Abb. 12) und anti-Kaninchen Alexa Fluor 546 zur Färbung von PML (rot; Abb. 12) inkubiert (siehe 2.7.9). In CAP_{adh.} wurde nach 5-stündiger Infektion eine klare Kolokalisation von IE1 mit PML sichtbar. Das Bild entsprach dem der Positivkontrolle (HFF) 3 Stunden nach Infektion. (gelb; Abb. 12). Die Assoziation von IE1 an PML konnte in infizierten CAP_{adh.} aufgrund von experimentellen Gegebenheiten erst zu einem späteren Zeitpunkt nach Infektion untersucht werden. Infizierte HFF wiesen zudem eine größere Menge IE1-Protein auf, weshalb im Vergleich zu infizierten CAP_{adh.} eine größere Anzahl kolokalisierter Proteine beobachtet werden konnte. 24h nach Infektion war das grüne, IE1-spezifische Fluoreszenzsignal gleichmäßig über die Zellkerne der infizierten CAP_{adh.} verteilt (weißer Pfeil; Abb. 12). Gleichzeitig war kein rot-fluoreszierendes, PML-spezifisches Fluoreszenzsignal mehr zu beobachten. Dieser Umstand sprach für eine vollständige Dispersion von PML *bodies*. Die gleichen Beobachtungen konnten bei Betrachtung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen infizierter HFF gemacht werden. Auch hier war IE1 gleichmäßig über den Zellkern verteilt und PML nicht nachweisbar. Zusammenfassend zeigte dieses Experiment, dass die Interaktion von IE1 mit PML und die nachfolgende Auflösung der PML *bodies* in infizierten CAP_{adh.} in vergleichbarer Weise wie in Kontrollzellen erfolgte. Somit sollte HCMV auch in CAP-Zellen, ähnlich wie in HFF diesen zellulären Abwehrmechanismus umgehen können.

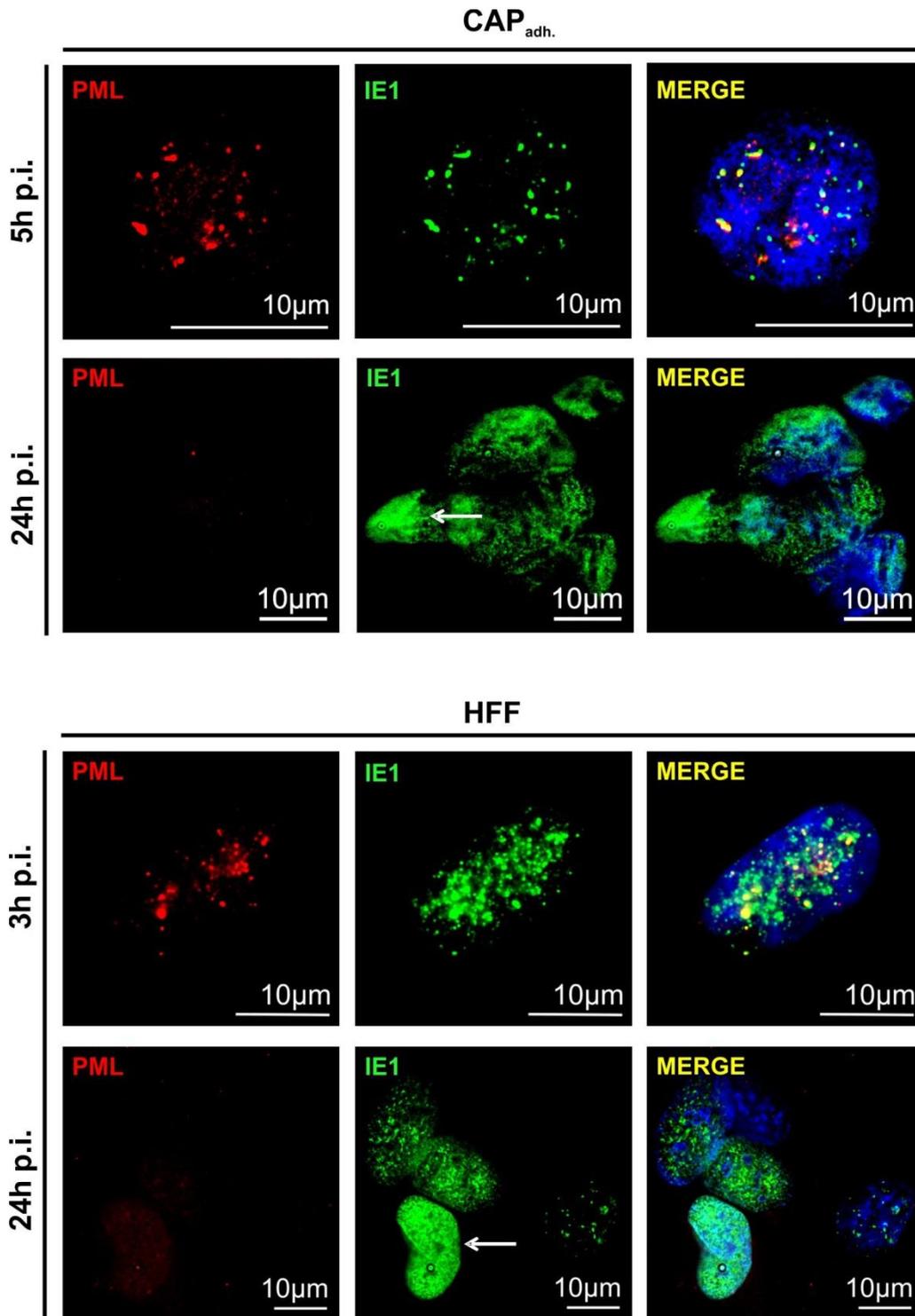


Abbildung 12: Immunfluoreszenz-Analyse der IE1-PML-Kolokalisation in infizierten CAP_{adh.} und HFF. CAP_{adh.} wurden mit RV-TB40/E-BAC7, *m.o.i.* 2 infiziert (oben), infizierte HFF wurden als Kontrolle mitgeführt (unten). Nach 5h und 24h (CAP_{adh.}) bzw. 3h und 24h (HFF) nach Infektion wurden die Zellen fixiert und mittels Immunfluoreszenzanalyse untersucht. Verwendete Primärantikörper, der IE1-spezifische mAκ p63-27 sowie der polyklonale PML-spezifische Kaninchen-Antikörper, wurden mit Hilfe der Sekundärantikörper anti-Maus Alexa Fluor 488 (grün) und anti-Kaninchen Alexa Fluor 546 (rot) detektiert. Zellkerne wurden mittels DAPI-Färbung (blau) sichtbar gemacht. Weiße Pfeile zeigen die gleichmäßige Verteilung von IE1 nach 24-stündiger Infektion im Zellkern bei fehlender Färbung von PML als Hinweis auf die Auflösung von ND10-Domänen an. *Merge*, übereinandergelegt.

3.5 Genexpression früher und später viraler HCMV-Proteine in CAP-Zellen

Die Expression früher (E) Gene des HCMV folgt unmittelbar auf die Synthese der IE-Proteine. Eine wichtige Gruppe dieser E-Gene kodiert für Proteine die direkt oder indirekt an der Replikation der viralen DNA beteiligt sind. Darüber hinaus werden noch eine Reihe weiterer Proteine synthetisiert, die für die nachfolgende Synthese viraler Partikel notwendig sind. In diesem Abschnitt sollte anhand einiger, ausgewählter Beispiele überprüft werden, ob CAP-Zellen die frühe Genexpression von HCMV unterstützen.

3.5.1 UL16- und UL84-Promotoraktivität in infizierten CAP-Zellen

Um beispielhaft zu testen, ob frühe Promotoren in CAP-Zellen nach HCMV-Infektion aktiviert werden, wurde in einem ersten, orientierenden Experiment eine virale Mutante eingesetzt, die das EGFP unter Kontrolle des frühen UL16-Promotors des Virus exprimiert (Digel et al., 2006). CAP_{adh.} wurden dafür zunächst mit RV-TB40/E- Δ UL16EGFP mit einer *m.o.i.* von 5 infiziert. Die Kulturen wurden 2 Tage nach Infektion mittels direkter Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Die infizierte Zellkultur zeigte eindeutig grün-fluoreszierende Zellen (Abb. 13a). Anhand der zugehörigen Phasenkontrastaufnahmen konnte abgeschätzt werden, dass etwa 80% der Zellen EGFP exprimierten; dies entspricht der Rate, die zuvor für die IE1-Expression in CAP_{adh.} beobachtet wurde (siehe Abb. 11).

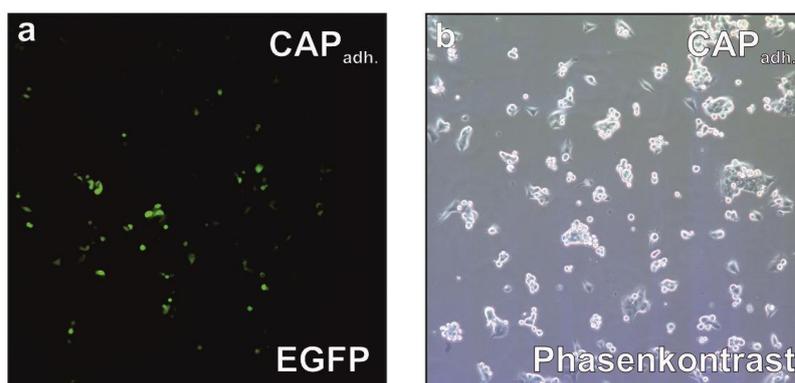


Abbildung 13: UL16-Promotoraktivität in CAP_{adh.} nach Infektion mit RV-TB40/E- Δ UL16EGFP. CAP_{adh.} wurden mit RV-TB40/E- Δ UL16EGFP, *m.o.i.* 5 infiziert und 2d p.i. fluoreszenzmikroskopisch untersucht. EGFP-Expression wurde anhand der grün-fluoreszierende Zellen sichtbar (a). (b), korrespondierende Phasenkontrast-Aufnahme.

Um diese Ergebnisse mit einem anderen Verfahren zu verifizieren, wurde eine Virusmutante eingesetzt, die die Glühwürmchen-Luciferase unter Kontrolle des viralen UL84-Promotors exprimiert (RV-TB40/E-UL84Luc; (Pöttsch et al., 2011). Das

Phosphoprotein UL84 ist in essentieller Weise an der Initiierung der lytischen DNA-Replikation beteiligt (Pari et al., 1993; Sarisky et al., 1996; Xu et al., 2002; Dunn et al., 2003; Xu et al., 2004). Es wird zu frühen Zeitpunkten der HCMV-Infektion in der Wirtszelle synthetisiert. Zunächst wurden CAP_{adh.} in 96-Well Platten ausgesät und über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurden unmittelbar vor Infektion zudem CAP_{sus.} in 96-Well Platten ausgesät. CAP_{adh.} wurden mit unverdünntem Virusüberstand, CAP_{sus.} mit einer *m.o.i.* von 5 der Mutante RV-TB40/E-UL84Luc infiziert. 1d p.i., 2d p.i. und 4d p.i. wurden die infizierten Zellkulturen lysiert und die Luciferase-Aktivität quantitativ bestimmt (siehe 2.7.12). Die Ergebnisse zeigten, dass es sowohl in CAP_{adh.} (Abb. 14a) als auch in CAP_{sus.} (Abb. 14b) zu einer Aktivierung des frühen UL84-Promotors gekommen war. Die Luciferase-Aktivität blieb über den gesamten Beobachtungszeitraum in CAP_{adh.} weitgehend konstant. Demgegenüber verringerte sich im Vergleich dazu die Luciferase-Aktivität in CAP_{sus.} im Verlaufe der Zeit deutlich (logarithmische Skala!). Zusammengefasst zeigten diese Experimente, dass frühe virale Promotoren sowohl in CAP_{adh.} wie auch in CAP_{sus.} nach HCMV Infektion aktiviert werden.

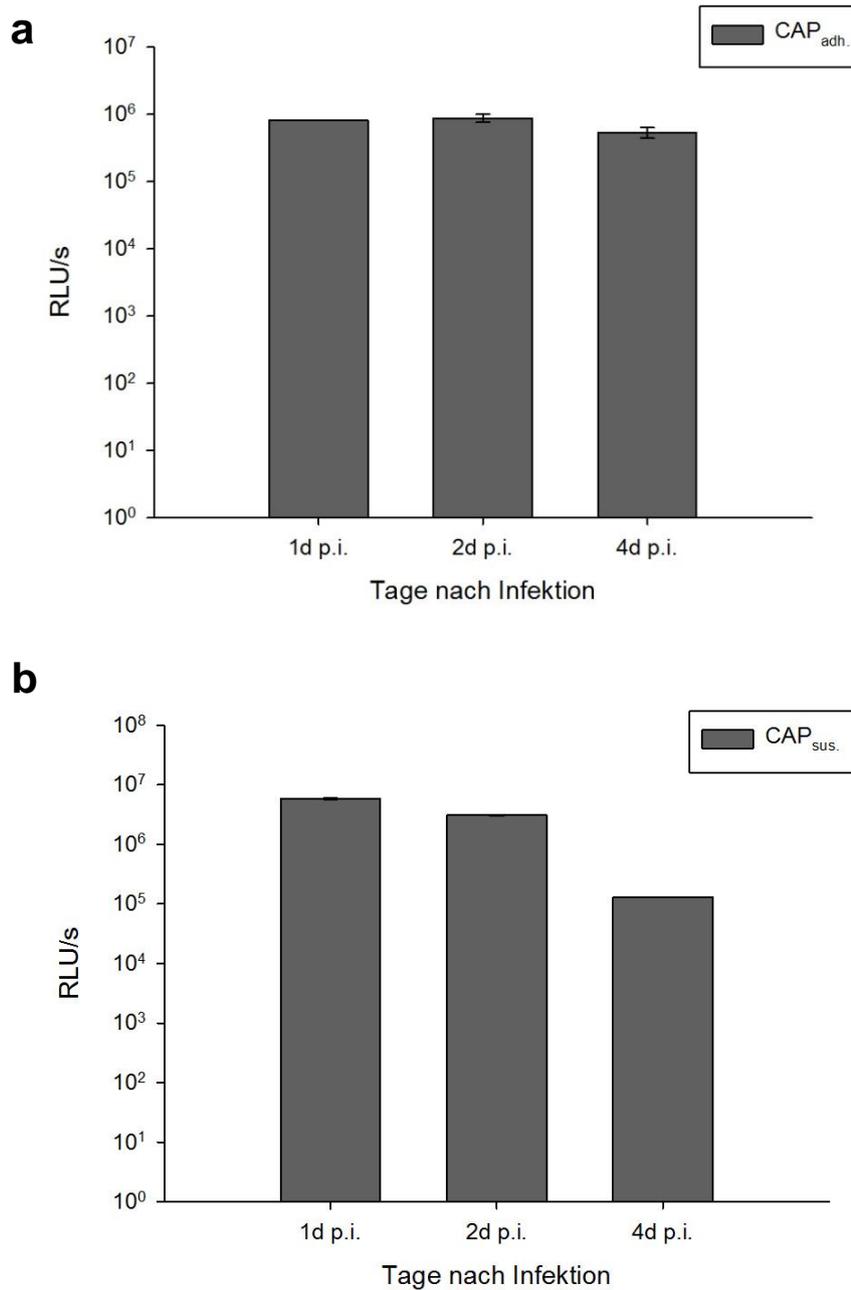


Abbildung 14: Analyse der UL84-Promotoraktivität in infizierten CAP-Zellen im Laufe der Infektion mit RV-TB40/E-UL84Luc. (a), Luciferase-Aktivität in Lysaten infizierter CAP_{adh.}, dargestellt in relativen Lichteinheiten pro Sekunde (RLU/s). **(b),** Luciferase-Aktivität in Lysaten von infizierten CAP_{sus.}, dargestellt in relativen Lichteinheiten pro Sekunde (RLU/s). Fehlerbalken ergeben sich aus der Mittelwert-Abweichung von 3 technischen Replikaten.

3.5.2 Expression der prozessiven Untereinheit UL44 der viralen DNA-Polymerase in infizierten CAP_{adh.} und CAP_{sus.}

Die Initiation der viralen DNA-Replikation nach HCMV-Infektion setzt die Synthese von sechs hoch konservierten Proteinen voraus, die den viralen Polymerase-Komplex bilden. Hierzu gehört die prozessive Untereinheit der Polymerase pUL44 (Colberg Poley et al., 2013). Dieses Protein und andere Untereinheiten des Polymerase-Komplexes häufen sich typischer Weise in nukleären Strukturen in der infizierten Zelle an, die als Replikationskompartimente bezeichnet werden. Im Folgenden sollte, beispielhaft anhand der Expression und Lokalisation von pUL44, die Frage geklärt werden, ob es in infizierten CAP-Zellen zur Synthese viraler Proteine kommt, die für die virale DNA-Replikation wichtig sind.

CAP_{adh.} wurden zunächst mit RV-TB40/E-BAC7 mit einer *m.o.i.* von 0,5 infiziert. Am Folgetag wurde ein kompletter Mediumwechsel vorgenommen. 5d nach Infektion wurde eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit einem pUL44-spezifischen mAK durchgeführt (siehe 2.7.9). In diesen Präparaten waren insgesamt weniger pUL44-positive Zellen zu beobachten, als in den Zellenproben die für IE1 bzw. pUL16 positiv waren. Insgesamt exprimierten nur etwa 20% der Zellen pUL44 (Daten nicht gezeigt). In den Zellkernen der pUL44-exprimierenden Zellen waren jedoch die erwarteten Replikationskompartimente zu sehen (Abb. 15a, b). Dies deutete darauf hin, dass sich in infizierten CAP-Zellen funktionelle Replikationskompartimente bildeten.

Für CAP_{sus.} wurde die Frage nach UL44-Synthese mittels Westernblot (siehe 2.7.8.2) adressiert. Hierfür wurden CAP_{sus.} zunächst mit RV-TowneUL130rep mit einer *m.o.i.* von 4 infiziert. Als Expressionskontrolle wurden zudem MRC-5 Zellen mitgeführt, die mit TowneUL130rep mit einer *m.o.i.* von 1 infiziert wurden. Einen Tag nach Infektion wurde bei den infizierten Zellkulturen ein kompletter Mediumwechsel vorgenommen. Zu den in Abbildung 15e angegebenen Infektionszeitpunkten wurden Zelllysate der infizierten Kulturen hergestellt und diese einer Westernblot-Analyse unterzogen. Die Ergebnisse zeigten eindeutig, dass pUL44 auch in CAP_{sus.} exprimiert wurde (Abb. 15e). Zudem konnte eine Zunahme der Synthespiegel im Laufe der Infektion beobachtet werden. Die vergleichsweise geringe Proteinmenge, die in der MRC-5 Kontrolle beobachtet wurden, beruhte höchstwahrscheinlich auf der initial geringeren Infektionsstärke, dem späten Zeitpunkt nach Infektion sowie der geringeren Auftragsmenge ($2 \cdot 10^5$ CAP_{sus.}; $1 \cdot 10^5$ MRC-5). Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse eindeutig, dass es in infizierten CAP-Zellen zu einer Expression der für die virale DNA-Replikation wichtigen prozessiven Untereinheit pUL44 kommt und dass sich in diesen Zellen virale Replikationskompartimente ausbilden.

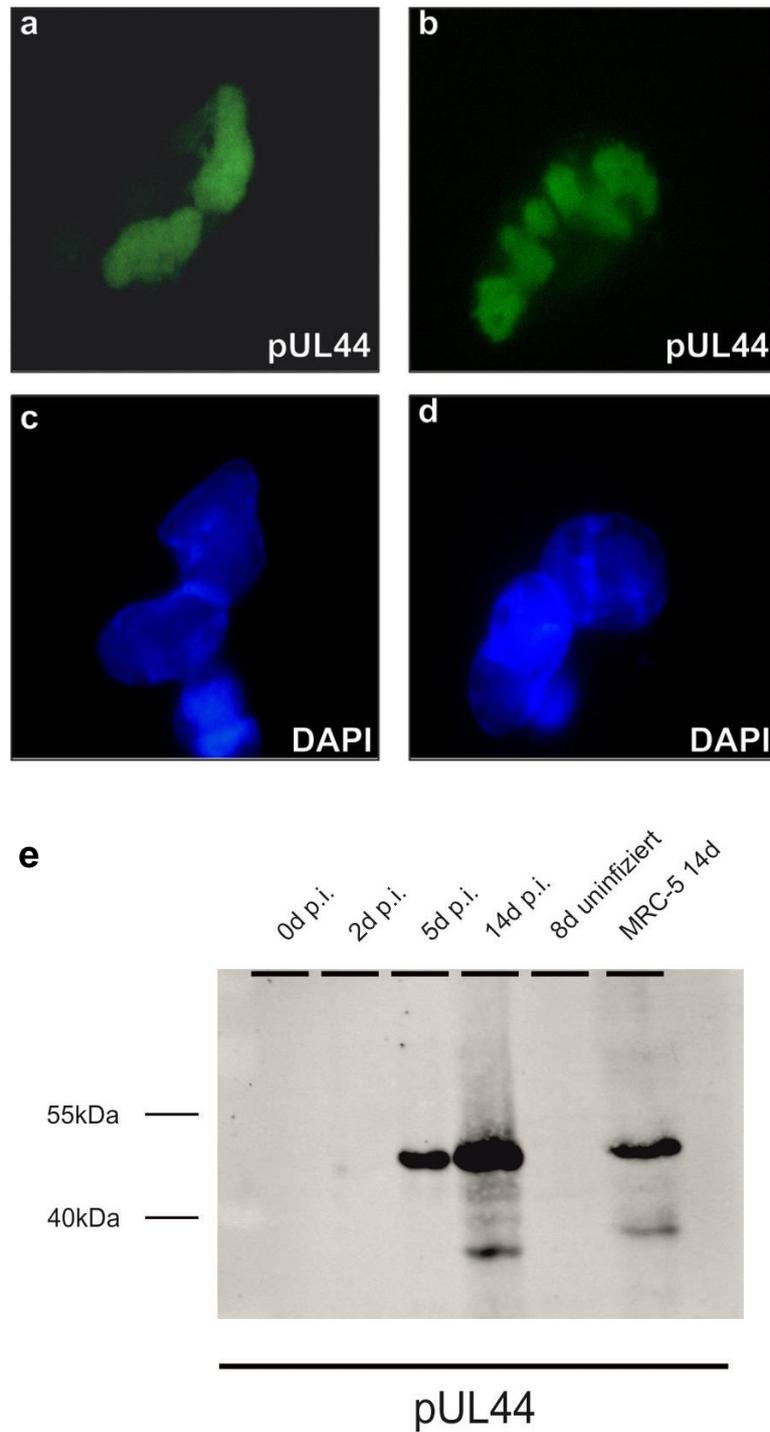


Abbildung 15: Analyse der pUL44-Expression in infizierten CAP-Zellen. (a-d), indirekte Immunfluoreszenzanalyse der pUL44-Expression in CAP_{adh.} am 5. Tag nach Infektion mit RV-TowneUL130rep. (a, b), Anfärbung mit einem pUL44 spezifischen mAK. (c, d), Anfärbung der Zellkerne mit DAPI. (e), Westernblot-Analyse der Expression von pUL44 in CAP_{sus.} Zelllysate wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion hergestellt und analysiert. MRC-5, humane Lungenfibroblasten.

3.5.3 Expression des *early-late* Phosphoproteins pp65 in CAP-Zellen

Das in der *early-late* Phase der HCMV-Infektion gebildete Phosphoprotein pp65 ist der Hauptbestandteil des viralen Teguments, sowohl von Virionen als auch von DBs (Varnum et al., 2004; Reyda et al., 2014a, b). Es spielt eine Rolle bei der Einlagerung anderer viraler Proteine, wie beispielsweise von pUL25, pUL69 oder pUL97, in neu synthetisierte Viruspartikel (Chevillotte et al., 2009). Daher sollte an dieser Stelle getestet werden, ob pp65 in infizierten CAP-Zellen exprimiert wird. Dafür wurden CAP_{adh.} zunächst mit RV-TB40/E-ΔUL16EGFP mit einer *m.o.i.* von 10 infiziert. Als Kontrolle wurden MRC-5 mitgeführt, die mit RV-TB40/E-ΔUL16EGFP mit einer *m.o.i.* von 1 infiziert wurden. Einen Tag nach Infektion wurde bei allen infizierten Zellkulturen ein kompletter Mediumwechsel vorgenommen. Zelllysate wurden 6 Tage nach Infektion durch Resuspension in Laemmli-Puffer gewonnen und die Proben anschließend mittels Westernblot (siehe 2.7.8) auf pp65-Expression hin untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass pp65 in infizierten CAP_{adh.} 6 Tage nach Infektion nachweisbar war. Die Proteinmengen waren zudem mit denen in der MRC-5 Kontrolle vergleichbar (Abb. 16a). Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass CAP_{adh.} initial mit einer 10-fach höheren Dosis infiziert worden waren.

Zur Analyse der subzellulären Lokalisation von pp65 in CAP_{sus.} wurden diese mit RV-TowneUL130rep mit einer *m.o.i.* von 0,5 infiziert. 1d, 2d und 3d nach Infektion wurden Zytospin-Präparate der infizierten Zellkulturen angefertigt (siehe 2.7.10) und diese anschließend mittels Lichtmikroskopie untersucht. Einen Tag nach Infektion waren einige der Zellen schwach rot gefärbt. An dieser Stelle konnte nicht unterschieden werden, ob dieser Nachweis von pp65 das Resultat der Einschleusung des Tegumentproteins aus infizierenden Partikeln war oder ob bereits zu einem so frühen Zeitpunkt pp65-Neusynthese erfolgte (Abb. 16b). Nach zweitägiger Infektion konnte in einem Teil der infizierten CAP_{sus.} eindeutig pp65 nachgewiesen werden. Zu diesem Zeitpunkt war der Nachweis von pp65 mit hoher Wahrscheinlichkeit auf Neusynthese zurückzuführen. Das Protein war hier ausschließlich nukleär lokalisiert (Abb. 16c). 3 Tage nach Infektion war das Signal der pp65-positiven Zellen nun ausschließlich zytoplasmatisch zu finden (Abb. 16d). Diese Veränderung der pp65-Lokalisation im Laufe der Infektion ähnelt der, die auch in spät-infizierten, permissiven Fibroblasten zu sehen ist. Eine solche Lokalisation wird als entscheidend für die korrekte Zusammensetzung des viralen Teguments in Tochterpartikeln angesehen. Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse beider Experimente, dass die Infektionskaskade innerhalb einer HCMV-Infektion bis hin zur Expression von *early-late* Proteinen in infizierten CAP-Zellen unterstützt wird.

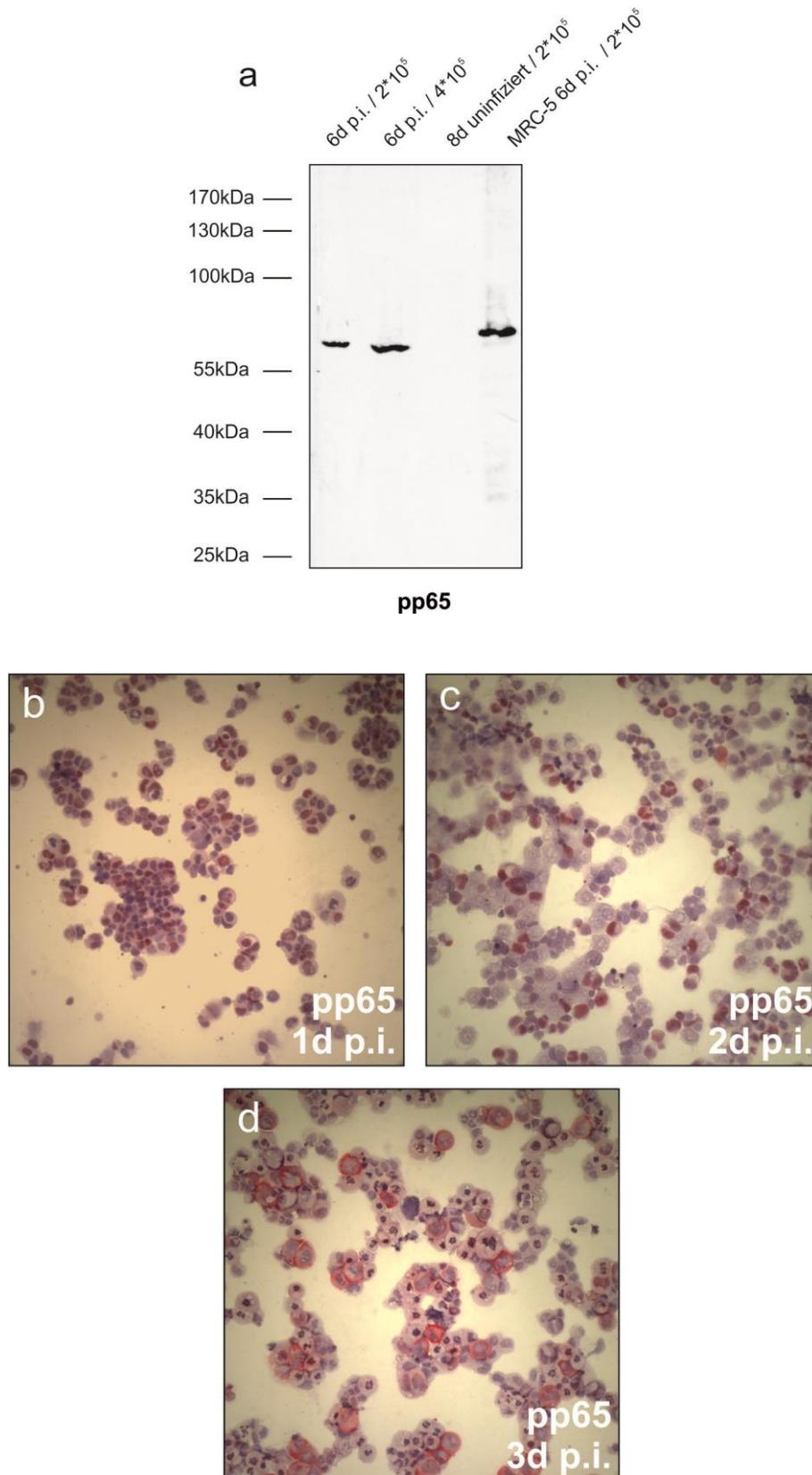


Abbildung 16: Analyse der viralen pp65-Proteinsynthese in infizierten CAP-Zellen. (a), CAP_{adh.} wurden mit RV-TB40/E- Δ UL16EGFP mit einer *m.o.i.* von 10 infiziert, MRC-5 (Kontrolle) mit einer *m.o.i.* von 1. Am Tag 6 nach Infektion wurden die Zellen lysiert und einer Westernblot-Analyse mit einem pp65-spezifischen mAK unterzogen. (b-d), CAP_{sus.} wurden mit RV-TowneUL130rep mit einer *m.o.i.* von 0,5 infiziert. 1d, 2d und 3d nach Infektion wurden Zytospin-Präparate der infizierten Zellkulturen angefertigt (siehe 2.7.10). Die pp65-Färbung erscheint rot.

3.5.4 Untersuchung der Synthese des späten Proteins pp28 in HCMV-infizierten CAP_{adh.}

Späte HCMV-Gene werden nach viraler DNA-Replikation exprimiert (Anders et al., 2007). Sie kodieren hauptsächlich für Proteine, die strukturelle Komponenten der Virionen darstellen, sie sind aber auch am Prozess des *Assembly* sowie *Egress* der neu-synthetisierten viralen Partikel beteiligt (Kalejta, 2008b). Ein Vertreter der späten HCMV-Proteine ist das Tegumentprotein pp28 (Meyer et al., 1988; Varnum et al., 2004). Neben anderen Tegumentproteinen wie pp150, pp65 und pUL25 sowie einigen Glykoproteinen lokalisiert und akkumuliert es im *Assembly Compartment* (AC) infizierter Zellen (Battista et al., 1999; Sanchez et al., 2000b) und ist dort größtenteils an der Umhüllung von Tegumentproteinen und Kapsiden beteiligt (Seo et al., 2007). Dieser Umstand macht es für die HCMV-Morphogenese und somit für die Produktion infektiöser Viren essentiell (Seo et al., 2006; Liu et al., 2009). Im Folgenden sollte daher mit Hilfe der Durchflusszytometrie getestet werden, ob die Synthese von pp28 in infizierten CAP_{adh.} nachgewiesen werden kann. CAP_{adh.} wurden dafür zunächst wie in 2.5 beschrieben ausgesät und am Folgetag mit RV-TB40/E-BAC4 Δ UL5-9 mit einer *m.o.i.* von 2 infiziert. Zur Inaktivierung der an der Zelloberfläche verbliebenen Viren wurde das Inokulum 1,5h nach Infektion entfernt und die Zellen daraufhin mit 0,14 M NaCl / 0,1 M Glycin (pH 3.0)-Lösung für 1min inkubiert. Anschließend erfolgte ein Waschriff mit jeweiligem Medium, bevor die Zellen bis zur weiteren Verwendung bei 37°C, 5%CO₂ inkubiert wurden. 3d p.i. wurden die infizierten CAP_{adh.} geerntet und anschließend in 75% Ethanol fixiert. Zur Analyse der Proteinexpression wurde wie in 2.7.4.2 mit spezifischen Antikörpern gegen IE1 (Positivkontrolle) und pp28 inkubiert, deren Bindung wiederum mit Hilfe eines AF646-gekoppelten anti-Maus Sekundärantikörpers sichtbar gemacht wurde. Die in diesem Experiment als Positivkontrolle verwendete IE1-Färbung zeigte eindeutig IE1-positive Zellen (Abb. 17b). Annähernd 30% der infizierten CAP_{adh.} exprimierten IE1 drei Tage nach Infektion. pp28-Expression konnten jedoch nur in vereinzelt Zellen nachgewiesen werden (Abb. 17c). Dieser Umstand sprach für eine ineffiziente Expression der späten viralen Gene und könnte eine Erklärung dafür sein, weshalb nur sehr geringe Mengen infektiöser Viren im Zellkulturüberstand infizierter CAP_{adh.} gefunden werden konnten. Im Gegensatz dazu konnten keine pp28-positiven Zellen in infizierten CAP_{sus.} beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Dies korrelierte mit dem fehlenden Nachweis der Synthese von Tochterviren in CAP_{sus.}

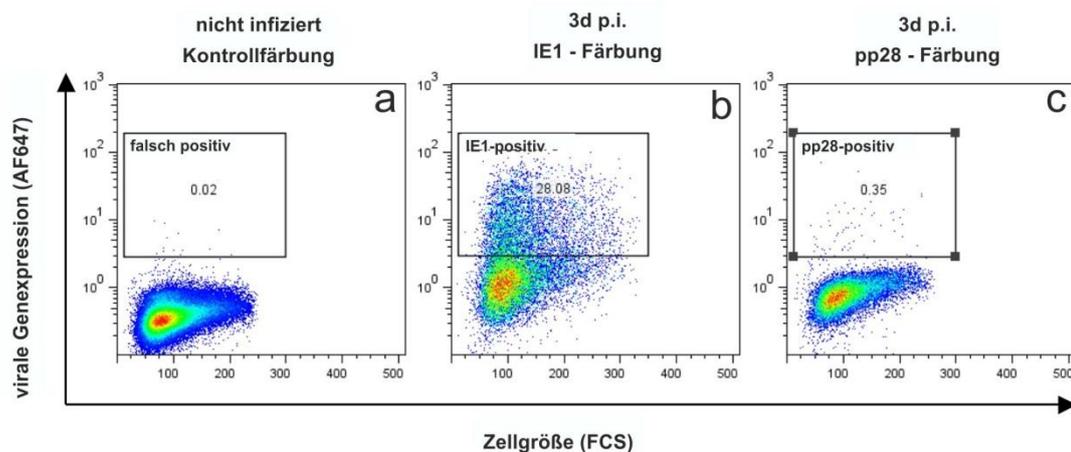


Abbildung 17: FACS-Analyse der viralen pp28-Genexpression in infizierten CAP_{adh.} 3 Tage nach Infektion. CAP_{adh.} wurden mit RV-TB40/E-BAC4ΔUL5-9 mit einer *m.o.i.* von 2 infiziert. (a), Ausschluss von falsch positiven Ergebnissen durch Inkubation infizierter CAP_{adh.} mit einer Maus-Isotypenkontrolle. (b), IE1-positive Zellen (Positivkontrolle). (c), pp28-synthetisierende Zellen. Die Anzahl fluoreszierender Zellen (AF647) wurde gegen die Zellgröße (FCS) aufgetragen.

3.6 Replikation viraler DNA in HCMV-infizierten CAP_{adh.} und CAP_{sus.}

Ein entscheidender Schritt im Lebenszyklus von HCMV ist die Initiation der viralen Genomreplikation. Um die Frage zu klären, ob virale DNA in HCMV-infizierten CAP-Zellen repliziert wird, sollte die Amplifizierung viraler Genome mit Hilfe der qPCR untersucht werden. Hierfür wurden zunächst CAP_{adh.} (Abb. 18a) und CAP_{sus.} (Abb. 18b) mit RV-TowneUL130rep mit einer *m.o.i.* von 2,5 infiziert. HFF (Abbildung 18c) sowie HEK293 (Abb. 18d) wurden als Positiv- bzw. Negativkontrolle mitgeführt. 1,5h nach Infektion wurde das Inokulum entfernt und die Zellen daraufhin mit 0,14 M NaCl / 0,1 M Glycin (pH 3.0)-Lösung für 1min inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen entweder mit oder ohne den Inhibitor der viralen DNA-Polymerase PAA (0,25 mg/mL) inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion wurden die infizierten Zellen gesammelt, die virale DNA extrahiert (siehe 2.7.1.1) und mittels des ABI Prism 7500 *real-time* PCR System quantifiziert. Die Ergebnisse wurden in Genomkopien pro Zelle angegeben.

Die Spiegel viraler DNA in CAP_{adh.} fielen, bezogen auf den Startwert, nach zweitägiger Infektion etwas ab. Ein solcher leichter Abfall war auch bei HFF zu beobachten und entsprach der Erwartung. Nach viertägiger Infektion stiegen die Spiegel in CAP_{adh.} auf etwa 1000 Genomkopien pro Zelle an (Abb. 18a), um anschließend nach 6 Tagen wieder leicht abzufallen. Im Gegensatz dazu sanken die Genomspiegel in den Proben, die mit PAA behandelt wurden ab, ohne dass im weiteren Verlauf ein Wiederanstieg zu beobachten gewesen wäre. Dies zeigte, dass die virale DNA-Replikation in CAP_{adh.}

initiiert wird. In infizierten CAP_{sus.} konnte ebenfalls ein Abfall der Genomkopienzahl zwei Tage nach Infektion beobachtet werden. Jedoch stiegen die Genomspiegel hier nicht wieder an. Auch konnte kein Unterschied in den mit PAA behandelten bzw. unbehandelten Proben beobachtet werden (Abb. 18b). Daher musste an dieser Stelle davon ausgegangen werden, dass die virale DNA-Replikation von CAP_{sus.} nicht oder nur sehr ineffizient unterstützt wird. Auch die in CAP_{adh.} detektierten DNA-Spiegel waren im Vergleich zu den in HFF beobachteten deutlich geringer (Abb. 18c). In HFF konnte sowohl nach vier wie auch nach sechs Tagen nach Infektion ein klarer, PAA-sensitiver Anstieg der viralen DNA-Spiegel gemessen werden. In der Negativkontrolle HEK293 konnte wie erwartet keine virale DNA-Replikation beobachtet werden (Abb. 18d). Zusammengefasst konnte mit diesen Experimenten nachgewiesen werden, dass CAP_{adh.} die Replikation des HCMV-Genoms unterstützen.

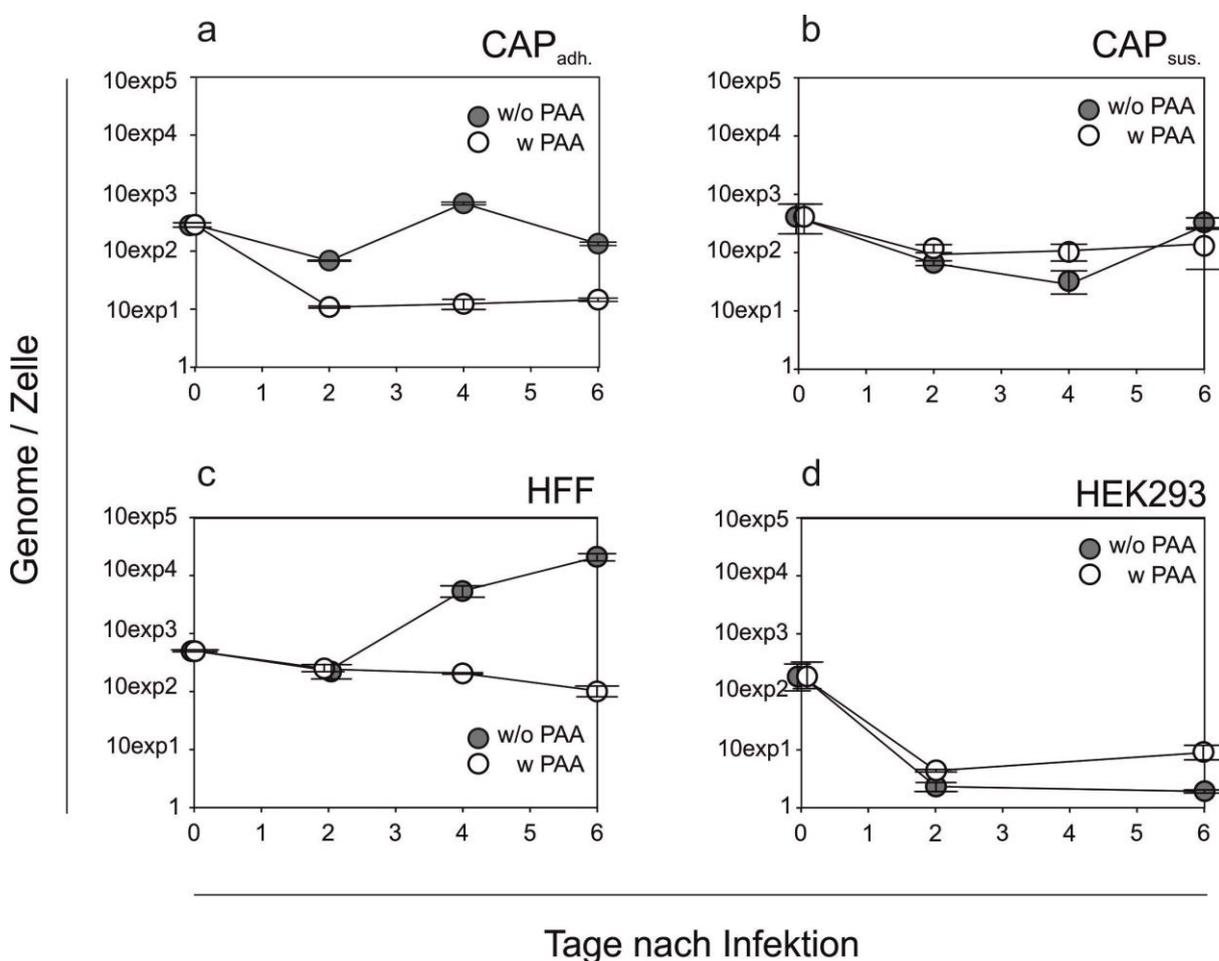


Abbildung 18: Quantitative PCR-Analyse der viralen Genomreplikation in infizierten CAP-Zellen. CAP_{adh.} (a) und CAP_{sus.} (b) wurden mit RV-TowneUL130rep mit einer *m.o.i.* von 2,5 infiziert. HFF (c) und HEK293 (d) wurden als Positiv- bzw. Negativkontrolle mitgeführt. w PAA, Inkubation mit 0,25µg/ml PAA. w/o PAA, Inkubation ohne PAA. Fehlerbalken repräsentieren die Mittelwertabweichung aus drei technischen Replikaten.

3.7 Analyse der Morphogenese viraler Partikel in HCMV-infizierten CAP-Zellen

3.7.1 Nachweis neusynthetisierter, viraler Kapside in infizierten CAP_{adh.} und CAP_{sus.} mittels TEM

Ein wichtiges Kennzeichen für eine produktive HCMV-Infektion ist die Bildung nukleärer Kapside. Im Zuge der Kapsidmorphogenese kommt es zur Bildung unterschiedlicher Kapsidformen. Stabile A- und B-Kapside sind dabei typischerweise Nebenprodukte der Kapsid-Morphogenese. A-Kapside enthalten keine virale DNA und entstehen bei abortiver DNA-Verpackung. B-Kapside enthalten sogenannte *scaffolding*-Proteine. Diese sind für die Anordnung viraler Strukturproteine essentiell, darunter zum Beispiel das *major capsid protein* (MCP) sowie das *smallest capsid protein* (SCP). Auch in dieser Kapsidform ist die virale DNA-Verpackung unvollständig verlaufen. C-Kapside wiederum werden durch Inkorporation viraler DNA gebildet. Aus ihnen können später infektiöse Virionen entstehen (Gibson et al., 2013). Diese C-Kapside werden durch die innere und äußere Kernmembran ausgeschleust. Es folgt die Reifung der Virionen durch Anlagerung viraler Tegumentproteine im *viral Assembly Compartment* (vAC) des Zytoplasmas der infizierten Wirtszelle (Sanchez et al., 2000a, b). Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Kapsid-Morphogenese auch in infizierten CAP-Zellen unterstützt wird. Hierfür wurden CAP_{adh.} und CAP_{sus.} mit RV-Towne-UL130rep mit einer *m.o.i.* von 5 infiziert. Als Kontrolle wurden zudem HFF mitgeführt und diese mit RV-TowneUL130rep, *m.o.i.* 1 infiziert. 3 Tage nach Infektion wurden die Zellen zunächst mit einer 2,5% Glutaraldehyd / 0,1 M Cacodylatpuffer / 0,1 M Saccharose-Lösung für 2 Stunden fixiert. Die Polymerisation erfolgte bei 65°C für 48h in purem Araldit. Aus diesen Präparaten wurden daraufhin Ultradünnschnitte angefertigt (siehe 2.8). Diese wurden mittels TEM untersucht. In CAP_{adh.} konnten sowohl B-Kapside, die unter elektronenmikroskopischer Betrachtung einen durchscheinenden Kern aufwiesen, wie auch reife C-Kapside beobachtet werden. Diese zeigten eine dicht-gepackte *Core*-Struktur (Abb. 19a). Die Morphologie der Kapside glich der, die im Zellkern infizierter HFF beobachtet werden konnten (Abb. 19c). Im Vergleich dazu waren in CAP_{sus.} wesentlich weniger virale Kapside detektierbar. Hier konnten nur B-Kapside gefunden werden. Dies sprach für eine verminderte DNA-Verpackung (Abb. 19b). Aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse musste davon ausgegangen werden, dass dies auf unzureichende Mengen an viraler DNA zurückzuführen war. Letztendlich lieferten die Resultate jedoch den Beweis, dass die virale Kapsid-Morphogenese von HCMV von CAP-Zellen unterstützt wird.

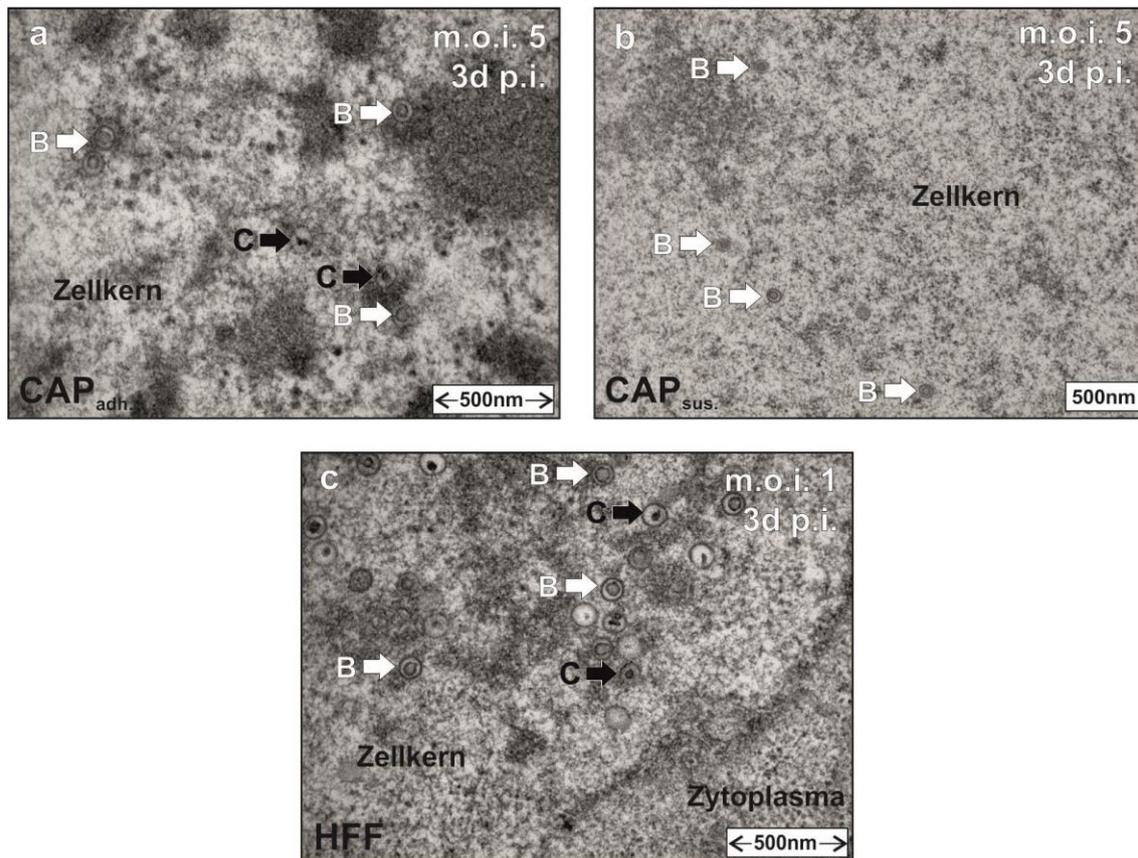


Abbildung 19: TEM-Aufnahmen der Kapsid-Morphogenese HCMV-infizierter CAP-Zellen. CAP_{adh.} (a) sowie CAP_{sus.} (b) wurden mit RV-TowneUL130rep mit einer *m.o.i.* von 5 infiziert. HFF (c) wurden als Kontrolle mitgeführt und mit einer *m.o.i.* von 1 infiziert. B, unreife B-Kapside. C, reife C-Kapside.

3.7.2 Analyse der viralen Partikelmorphogenese im Zytoplasma infizierter CAP_{adh.} mittels TEM

Nach Austritt der nackten Kapside aus dem Zellkern ins Zytoplasma der infizierten Wirtszelle erfolgt die Reifung des Teguments sowie die Umhüllung der viralen Partikel. Dies geschieht an einem Membran-reichen Kompartiment, auch vAC genannt, das sich zu späten Zeitpunkten der Infektion in der Nähe des Zellkerns bildet (Sanchez et al., 2000a; Gibson et al., 2013). Es sollte getestet werden, ob die zytoplasmatische Partikelmorphogenese des HCMV in infizierten CAP-Zellen in vergleichbarer Weise wie in infizierten HFF (Kontrolle) erfolgte. In vorangegangenen Experimenten konnten keine viralen Partikel im Zytoplasma infizierter CAP_{sus.} beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Daher wurden hier nur CAP_{adh.} mit RV-TB40/E-BAC4ΔUL5-9 mit einer *m.o.i.* von 10 infiziert und 6 Tage nach Infektion mittels TEM untersucht (siehe 2.8). HFF wurden erneut als Kontrolle mitgeführt und mit einer *m.o.i.* von 1 infiziert. Ultradünnschnitte 8d infizierter HFF wurden anschließend mittels TEM untersucht. Bei Betrachtung der Aufnahmen infizierter CAP_{adh.} fiel zunächst auf, dass sich im

Zytoplasma Vesikel-reiche bzw. Membran-reiche Strukturen gebildet hatten, die dem in der Literatur beschriebenen vAC sehr ähnelten. In diesen Strukturen konnten zudem mehrere Virionen-ähnliche Partikel beobachtet werden, die wiederum in Vesikeln eingebettet waren (Abb. 20a). Diese Partikel ähnelten denen, die im Zytoplasma infizierter HFF zu beobachten waren und eindeutig als Virionen identifizierbar waren (Abb. 20b). In HFF waren zudem dicht gepackte, runde Strukturen zu sehen, die Ähnlichkeiten mit DBs aufwiesen (Abb. 20b). Auch in CAP_{adh.} waren mehrere dichte Strukturen im vAC zu erkennen, die jedoch deformiert aussahen und nicht eindeutig DBs zugeordnet werden konnten (Abb. 20a). Da der verwendete Stamm TB40/E bekannter Maßen nur wenig DBs produziert, war das Fehlen derartiger Partikel in CAP_{adh.} nicht überraschend. Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse, dass die virale Partikel-morphogenese von infizierten CAP_{adh.} unterstützt wird.

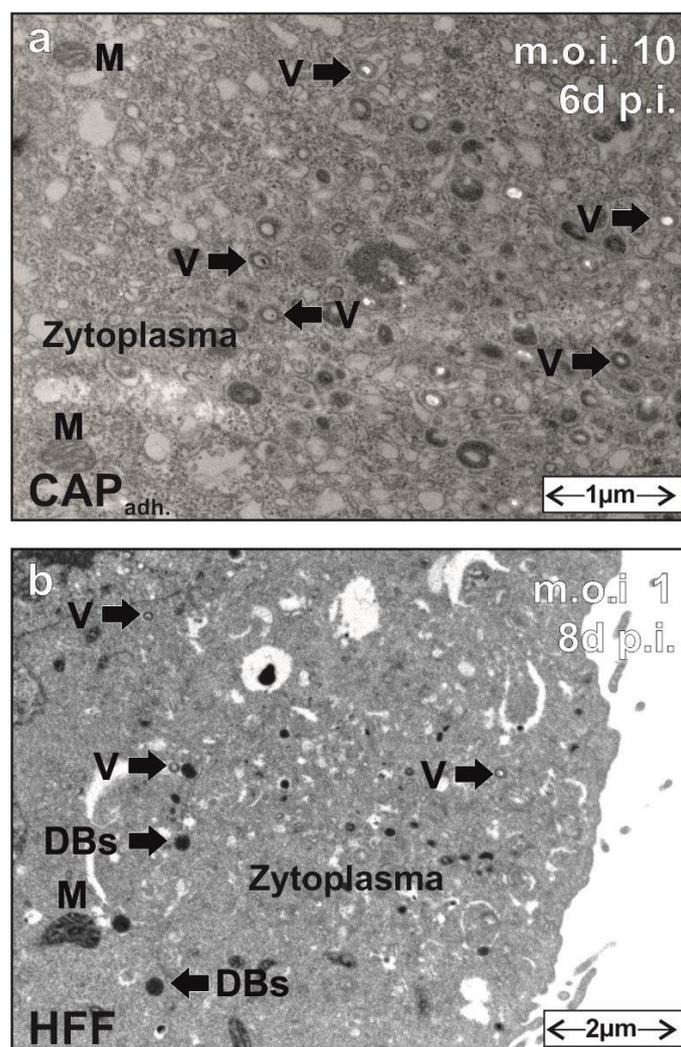


Abbildung 20: TEM-Analyse der Partikelmorphogenese HCMV-infizierter CAP_{adh.} zu späten Zeit-punkten der Infektion. CAP_{adh.} wurden mit RV-TB40/E-BAC4ΔUL5-9 mit einer *m.o.i.* von 10 infiziert. Als Kontrolle dienten HFF, die mit einer *m.o.i.* von 1 infiziert wurden. V, Virionen. DBs, Dense Bodies. M, Mitochondrium.

3.8 Analyse der aus HCMV-infizierten CAP_{adh.} freigesetzten Viruspartikel

Im Zuge der viralen Partikelmorphogenese werden neben Virionen auch nicht-infektiöse Partikel wie NIEPs und DBs gebildet. Die NIEPs stellen eine Partikelform dar, die in ihrer Proteinzusammensetzung reifen Virionen sehr ähnlich ist, jedoch keine virale Genome enthält. DBs bestehen hauptsächlich aus Tegumentproteinen und enthalten weder ein Nukleokapsid noch virale DNA (Gibson et al., 2013). Die Untersuchungen in dieser Arbeit hatten gezeigt, dass HCMV-infizierte CAP_{adh.} die virale Partikelmorphogenese unterstützen und infektiöse Partikel in den Zellkulturüberstand freisetzen. Im Folgenden sollte die Proteinzusammensetzung der freigesetzten Partikel untersucht und die Frage geklärt werden, ob im Zuge einer produktiven HCMV-Infektion neben Virionen auch von CAP-Zellen nicht-infektiöse Partikel freigesetzt werden. Hierfür wurden CAP_{adh.} mit RV-TowneUL130rep entweder mit einer *m.o.i.* von 5 (Abb. 21a) oder mit einer *m.o.i.* von 2,5 (Abb. 21b) infiziert. 7 Tage nach Infektion wurden die jeweiligen Zellkulturüberstände gesammelt und die darin enthaltenen Viruspartikel mittels eines positiven Dichte-/negativen Viskositäts-Gradienten-Systems getrennt und aufgereinigt (siehe 2.6.6). Die Gradienten zeigten drei Banden, die typischerweise auch bei der Virusaufreinigung von Kulturüberständen infizierter HFF sichtbar werden (Abb. 21c). Diese Banden entsprechen den drei Partikelformen, die aus HFF freigesetzt werden. Neben infektiösen Virionen sind dies NIEPs und DBs. Im oberen Teil der CAP_{adh.}-Gradienten wurde eine starke Bande sichtbar, die nach ihrer Lokalisation der NIEPs-Bande entsprach. Die darunter liegende Bande, die der „Virionen-Bande“ aus HFF entsprach, war deutlich schwächer. Darüber hinaus fand sich nur eine relativ schwache „Dense Body (DB)-Bande“. Diese Ergebnisse ließen darauf schließen, dass infizierte CAP_{adh.} wohl die gleichen HCMV-Partikelformen wie HFF freisetzen; gleichwohl schien die Menge an Virionen und DBs deutlich unter der zu liegen, die aus dem gleichen Volumen an Kulturüberstand aus HFF aufgereinigt werden kann. In einem nächsten Schritt wurde die Proteinzusammensetzung der Proben aus dem Gradienten mittels Gelelektrophorese (siehe 2.7.6.2) und darauffolgender Silberfärbung (siehe 2.7.7) analysiert. Das Proteinmuster der drei Partikeltypen (Abb. 21d) entsprach dem von Kontrollpartikeln, die aus Zellkulturüberstand infizierter HFF aufgereinigt wurden (Abb. 21e). Zusammengefasst legte das Ergebnis nahe, dass CAP_{adh.} in der Tat HCMV-Partikel produzieren und freisetzen, die den Partikeln aus HFF entsprechen. Allerdings waren die unter den gewählten Laborbedingungen erhaltenen Mengen der Partikel deutlich niedriger als die Mengen, die aus HFF-Kulturen erhalten wurden.

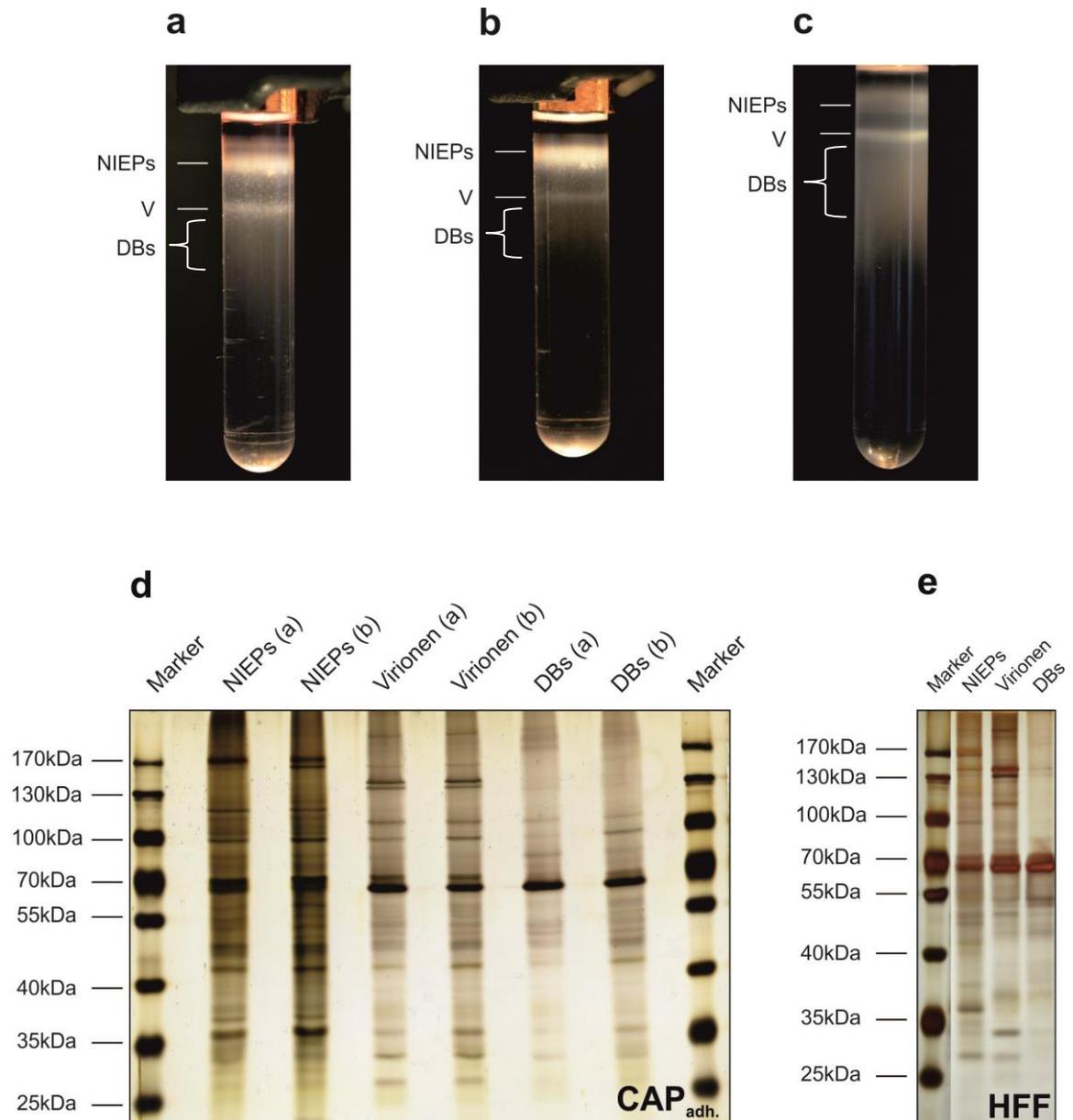


Abbildung 21: Aufreinigung von extrazellulären Viruspartikel aus Kulturüberständen HCMV-infizierter $CAP_{adh.}$ und HFF. $CAP_{adh.}$ wurden mit RV-TowneUL130rep mit einer *m.o.i.* von 5 (a) oder *m.o.i.* 2,5 (b) infiziert. HFF wurden als Kontrolle mitgeführt und mit RV-TowneUL130rep, *m.o.i.* 1 infiziert (c). Virusüberstände wurden nach 7d p.i. gewonnen und durch Gradienten-Ultrazentrifugation aufgereinigt. (d, e), Silbernitrat-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen, die zur Auftrennung von jeweils 2 μ g der verschiedenen Gradienten-Fractionen verwendet wurden.

3.9 Einfluss der adenoviralen Proteine E1A und E1B auf die HCMV-Infektion in CAP-Zellen

Ein Stopp des Zellzyklus in der G1/S-Phase ist eine Voraussetzung für die effiziente Initiation der viralen Genomreplikation nach HCMV-Infektion (Noris et al., 2002; Petrik et al., 2006; Spector, 2015). Demgegenüber stimulieren adenovirale E1-Proteine den Zellzyklus. In diesem Abschnitt sollte daher geprüft werden, ob dieser Widerspruch ursächlich für die begrenzte Vermehrungsfähigkeit von HCMV in CAP-Zellen war.

3.9.1 Expression des adenoviralen Proteins E1A in CAP_{adh.}, CAP_{sus.} und HEK293

In einem ersten, orientierenden Experiment sollten die Spiegel der Expression von E1A in CAP_{adh.} und CAP_{sus.} bestimmt werden. Vergleichend hierzu sollten analoge Analysen an HEK293 durchgeführt werden. Diese Zellen exprimieren ebenso die E1-Funktionen des Adenovirus Typ 5, sind jedoch bekannter Maßen, im Gegensatz zu CAP-Zellen, gegenüber der HCMV Infektion nicht permissiv. Zur Analyse der E1A-Expression wurde an dieser Stelle die Durchflusszytometrie eingesetzt. E1A konnte in der Tat in CAP_{adh.} und CAP_{sus.}, wie auch in HEK293 nachgewiesen werden. Zur Kontrolle mitgeführte HFF zeigten wie erwartet keine E1A-Expression (Abb. 22). Interessanterweise fanden sich in HEK293 deutlich höhere Spiegel an E1A als in den beiden CAP-Zellkulturen. Da HEK293 gegenüber HCMV-Infektionen nicht permissiv sind, unterstützte dieses Ergebnis die Annahme über einen negativen Einfluss von E1A auf die HCMV-Vermehrung.

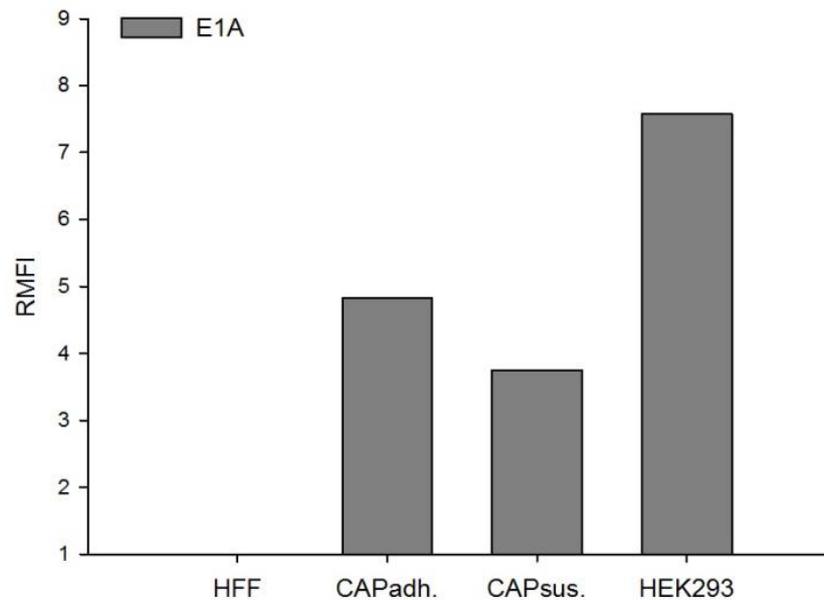


Abbildung 22: Durchflusszytometrische Analyse der Expression von E1A in CAP-Zellen, HEK293 und HFF. Die Ergebnisse wurden in der Einheit *relative mean fluorescence intensity* (RMFI) angegeben, die durch Division der E1A-MFI und der Isotypenkontrollen-MFI ermittelt wurde.

3.9.2 Stimulation der E1A-Expression durch die HCMV-Infektion

Die HCMV-Infektion stimuliert die Expression vom adenoviralen E1-Promotor (Spector et al., 1986; Tevethia et al., 1987; Kim et al., 2010). Es sollte daher getestet werden, ob im Laufe einer HCMV-Infektion in CAP-Zellen eine Steigerung der E1A-Genexpression beobachtet wird und damit eventuell inhibierende Effekte der adenoviralen Proteine auf die HCMV-Replikation verstärkt werden. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden CAP_{adh.} mit dem HCMV-Stamm TB40/E infiziert und die Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion lysiert. Mittels Bis-TRIS-PAGE (siehe 2.7.6.3) wurden die Proteine aufgetrennt und die Proteine E1A und β -Aktin anschließend mit Hilfe eines Westernblots (siehe 2.7.8) sichtbar gemacht (Abb. 23a). Beide Proteinmengen wurden ins Verhältnis zueinander gesetzt und damit die Expression an E1A über den beobachteten Infektionszeitraum quantifiziert (Abb. 23b). Die Ergebnisse bestätigten die Vermutungen, dass die HCMV-Infektion die E1A-Expression in CAP-Zellen steigert.

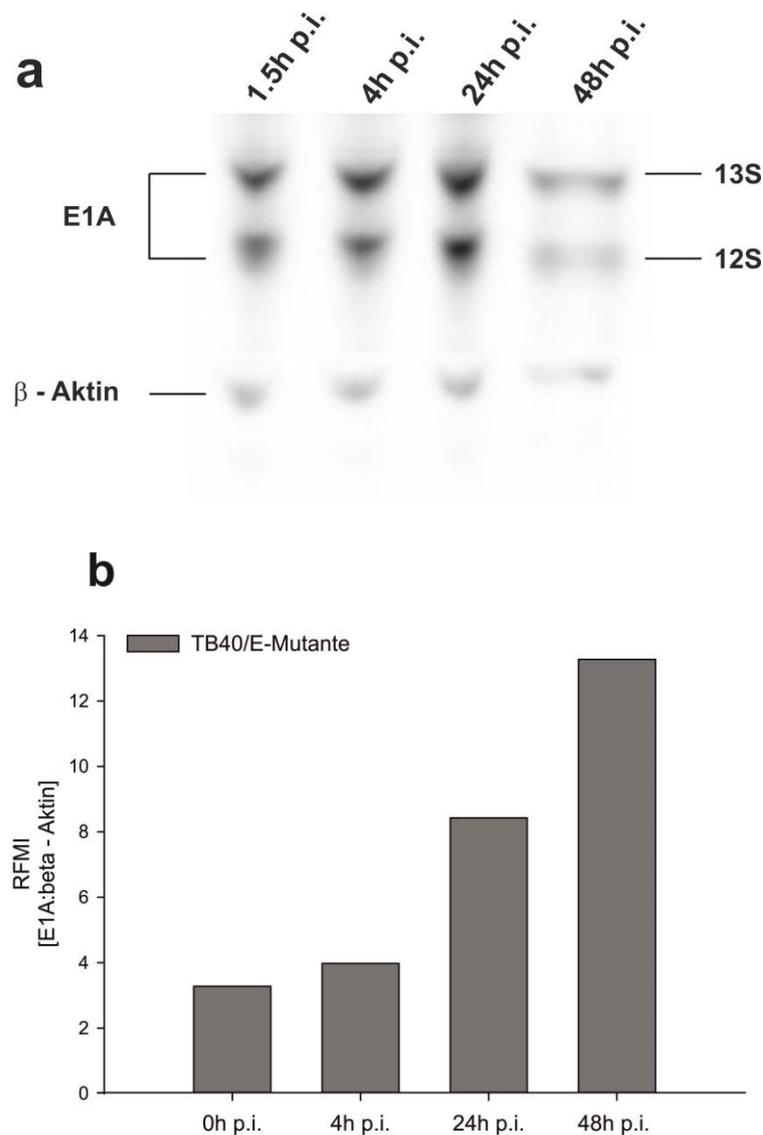


Abbildung 23: Transaktivierung des adenoviralen E1-Promotors durch die HCMV-Infektion. CAP_{adh.} wurden mit dem HCMV-Stamm TB40/E infiziert. Zelllysate wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion im Westernblot hinsichtlich der E1A-Spiegel mittels „Odyssey Infrared Imager CLx“ untersucht (**a**) und anhand des internen beta-Aktin-Standards mit der geräteinternen Software „Image Studio Lite“ von LI-COR quantifiziert (**b**; E1A:beta-Aktin).

(**a**), alternatives Spleißen des E1A-Transkripts erzeugt mRNAs die für 5 verschiedene Proteine codieren. Früh nach Infektion als auch bei transformierten Zellen finden sich vorwiegend die zwei großen Isoformen (13S und 12S mRNA). Die synthetisierten Proteine liegen im Bereich von 35-46 kDa. (**b**), für die Quantifizierung der E1A-Synthese wurde das Signal beider E1A-Banden gegen den internen beta-Aktin-Standard verwendet.

3.9.3 Zellzyklusanalyse nicht infizierter CAP_{adh.}, CAP_{sus.} und HEK293 zur Bestimmung der Zellzyklusphase unmittelbar vor HCMV-Infektion

Die Infektion von Zellen, die sich in der S-Phase des Zellzyklus befinden, ist für die Initiation der HCMV-Infektion ungünstig (Petrik et al., 2006; Qian et al., 2010; Caffarelli et al., 2013; Eifler et al., 2014). E1A stimuliert Zellen jedoch zum Eintritt in die S-Phase.

Daraus folgte die Überlegung, dass E1A hierdurch ein für die HCMV-Infektion ungünstiges Zellmilieu schafft und sich dadurch die begrenzte Vermehrungsfähigkeit von HCMV in CAP-Zellen erklären lässt. Es sollte daher geprüft werden, wie sich die Verteilung der Zellzyklusphasen in CAP-Zellkulturen vor HCMV-Infektion darstellte. In einem Vorversuch wurde die Verteilung der Zellzyklusphasen in permissiven HFF unmittelbar vor HCMV-Infektion bestimmt (siehe 2.7.4.2). Hierbei fanden sich etwa 50% der Zellen in der für die IE-Genexpression favorisierten G1-Phase, während ungefähr 18% zelluläre DNA replizierten (S-Phase) und sich ca. 17% der Zellen in der, der Mitose vorausgehenden, G2-Phase befanden (Daten nicht gezeigt). Im Folgenden wurden analoge Experimente an CAP_{adh.}, CAP_{sus.} sowie HEK293 durchgeführt. Die Resultate zeigten klare Unterschiede auf. Annähernd 62% der CAP_{adh.} befanden sich zum Zeitpunkt der Analyse in der, für die HCMV-Infektion günstigen, G1-Phase (Abb. 24a). Ca. 38% der Zellen befanden sich in den nicht favorisierten Zellzyklusphasen (S; G2). Somit war die Verteilung der Zellzyklusphasen in CAP_{adh.} unmittelbar vor Infektion mit der permissiver HFF vergleichbar. Interessanterweise lieferten CAP_{sus.} bzw. HEK293 gänzlich andere Resultate. In beiden Fällen befand sich der Hauptteil der Zellpopulation in ungünstigen Zellzyklusphasen (Abb. 24b, c). Von den untersuchten Zelltypen unterstützten CAP_{adh.} die HCMV-Infektion am besten, CAP_{sus.} dahingegen nur bedingt, während HEK293 nicht permissiv gegenüber einer produktiven HCMV-Infektion waren. Diese Ergebnisse legten nahe, dass die vermehrte Permissivität von CAP_{adh.} gegenüber CAP_{sus.} und HEK293 in der Tat, zumindest zum Teil, in der für die HCMV günstigen Verteilung der Zellzyklusphasen begründet ist. Gleichzeitig konnte dadurch gezeigt werden, dass die deutlich verminderte Permissivität von CAP_{adh.} gegenüber HCMV-Replikation, im Vergleich zu HFF, nicht auf Unterschiede in der Zellzyklusphase bei Eintritt der Viren in die Zelle begründet waren.

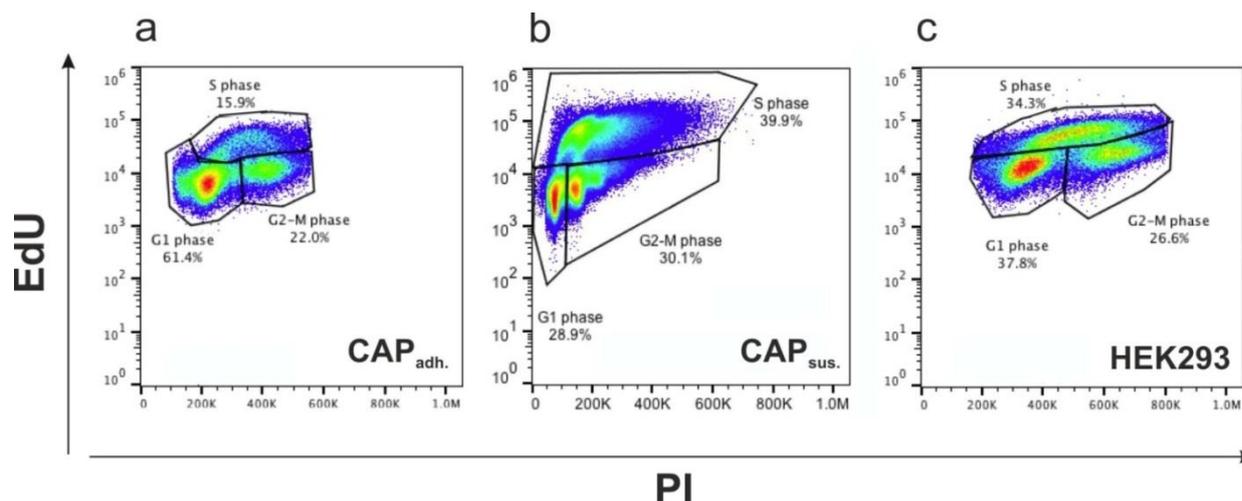


Abbildung 24: Zellzyklusanalyse nicht infizierter CAP-Zellen und HEK293 mittels Durchflusszytometrie. CAP_{adh.} (a), CAP_{sus.} (b) sowie HEK293 (c) wurden nach Aussaat (siehe 2.5) über Nacht inkubiert und anschließend der Analyse zugeführt. EdU, 5-Ethynyl-2-deoxyuridine. PI, Propidiumiodid.

3.9.4 Analyse der Expression viraler Gene in unterschiedlichen Zellzyklusphasen von CAP_{sus.}

Trotz der sehr effizienten IE-Genexpression in HCMV-infizierten CAP_{sus.} sowie einer eindeutigen Expression früher Gene konnte keine virale DNA-Replikation nachgewiesen werden. Zudem waren keine infektiösen Virionen im Zellkulturüberstand infizierter Zellen nachweisbar. Erste Hinweise für die Gründe der ineffizienten Produktion infektiöser Nachkommen lieferten zufällige Beobachtungen, die in Aufnahmen einer Zytopspin-Analyse 3d p.i. gemacht wurden. Hierbei konnte in mehreren Zellkernen infizierter CAP_{sus.} Chromatinkondensation beobachtet werden (Abb. 25, weiße Pfeile).

Diese Resultate deuteten auf eine unzureichende Cyclin A2-Degradation hin (Eifler et al., 2014). Cyclin A2 wird zu Beginn der S-Phase synthetisiert und ist für die Initiation und Progression der zellulären DNA-Synthese verantwortlich. Auch spielt es eine Rolle beim Übergang der Zelle von G2- zur M-Phase (Spector, 2015). Sofern die lytische Genexpression HCMV-infizierter Zellen bereits begonnen hat, fördert ein unzureichender oder fehlender Abbau von Cyclin A2 einen Metaphase-Arrest. Im Zuge dessen kommt es zu abweichenden Spindelformationen und letztendlich zur Instabilität und darauffolgender Kondensation der Chromosomen (Eifler et al., 2014). HCMV verhindert dies, indem es über das Tegument Protein pp150 die Cyclin A2-Spiegel misst und die virale Genexpression bei zu hoher Konzentration, d.h. während der S-Phase reprimiert (Oduro et al., 2012; Bogdanow et al., 2013; Eifler et al., 2014). Um zu prüfen, ob ein solcher Mechanismus auch in CAP-Zellen nachweisbar war, wurden erneut Zellzyklus-Analysen durchgeführt. In diesem Falle wurde parallel die Expression des IE1 in den

verschiedenen Phasen als Surrogat für virale Genexpression gemessen. CAP_{SUS.} und HFF (Kontrolle) wurden nach Aussaat über Nacht inkubiert und am Folgetag unmittelbar vor Infektion für 30min mit EdU (25 µM CAP_{SUS.}, 10 µM HFF) inkubiert. Anschließend wurde mit RV-TB40/E-BAC4ΔUL5-9 mit einer *m.o.i* von 2 infiziert. 6h und 3d nach Infektion wurden die Zellen geerntet und mit 75% Ethanol fixiert. Zur Analyse der Expression von IE1 wurden die Zellen mit einem mAK über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurden Zellzyklusphase und virale Proteinexpression mittels Durchflusszytometrie analysiert (siehe 2.7.4.2). Die Analyse der pp65-Synthese diente als Unterscheidungshilfe zwischen Protein synthetisierenden und nicht synthetisierenden Zellen. Hierbei wurde davon ausgegangen, dass neu synthetisiertes pp65 erst 3 Tage nach Infektion in infizierten HFF durchflusszytometrisch nachweisbar wäre. Signale unterhalb dieses Schwellenwerts (Werte 6h p.i.) wurden als nicht Protein synthetisierende, Signale oberhalb (3d p.i.) als Protein synthetisierende Zellen gewertet. Der Schwellenwert wurde für alle weiteren Analysen übernommen (Isotypenkontrolle, IE1).

In der Tat befand sich nach sechsständiger Infektion im Vergleich zu Kontrollzellen (HFF) eine deutlich größere Fraktion IE1-exprimierender CAP_{SUS.} in der S-Phase des Zellzyklus (Abb. 26, IE1-Färbung). Im Zusammenhang mit der nachfolgenden, erhöhten Chromatinkondensation deutete dieses Ergebnis darauf hin, dass ein deutlicher Anteil der CAP_{SUS.} in der S-Phase infiziert wurden und nachfolgend abstarben. 3 Tage nach Infektion befand sich immer noch eine erhebliche Zahl IE1-positiver CAP_{SUS.} in der S-Phase des Zellzyklus. Zu diesem Zeitpunkt fanden sich jedoch auch pp65-positive Zellen in dieser Zellzyklusphase (Abb. 26, pp65-Färbung). Die wahrscheinlichste Erklärung hierfür war, dass es sich dabei um Zellen handelte, die initial in der G0/G1-Phase infiziert wurden und erst nachfolgend, nach IE1-Expression, in die S-Phase eintraten und somit der Chromatinkondensation entgingen.

Zusammengefasst deuteten die Ergebnisse darauf hin, dass in vielen der infizierter CAP_{SUS.} in der Tat der unvollständige Zellzyklusblock ein für die HCMV-Vermehrung ungünstiges Milieu verursacht. Die daraus folgende Beeinträchtigung der viralen Genomreplikation und Virusproduktion wäre somit eine plausible Erklärung für die fehlende bzw. nur sehr geringe Produktion infektiöser Viren in diesen Zellen. Ob der unzureichende Zellzyklusblock durch das Fehlen von inhibitorischen Faktoren des Virus oder durch eine zu schnelle Replikation von CAP_{SUS.} und damit verbunden eine hohe Fraktion von S-Phase Zellen zum Zeitpunkt der Infektion begründet ist, muss weiteren Analysen vorbehalten bleiben.

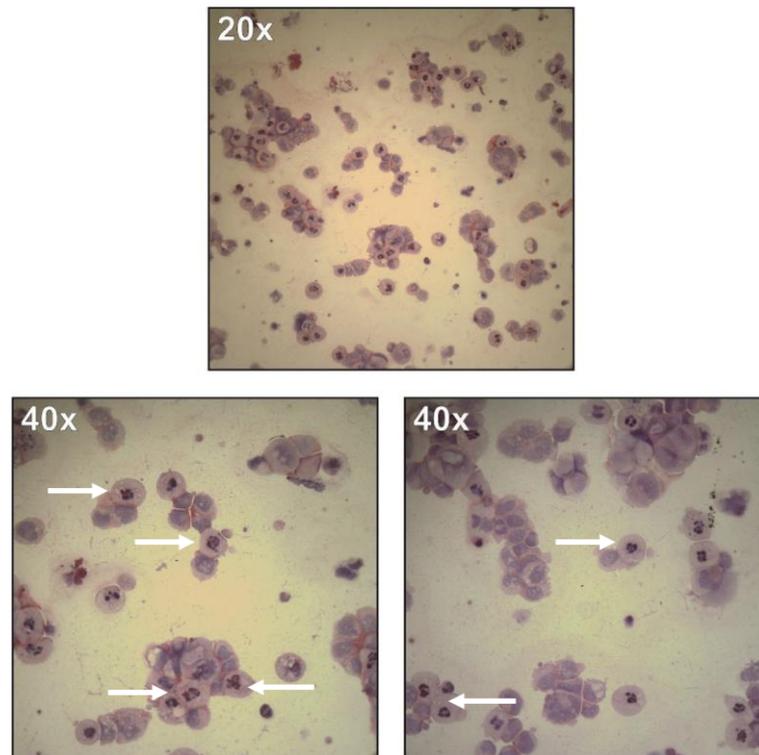


Abbildung 25: Chromatinkondensation in infizierten CAP_{sus}. 3 Tage nach Infektion. CAP_{sus} wurden mit RV-TowneUL130rep mit einer *m.o.i.* von 0,5 infiziert. 3d nach Infektion wurden Zytospin-Präparate der infizierten Zellkulturen angefertigt (siehe 2.7.10). Die Proben wurden daraufhin mittels Lichtmikroskopie untersucht. Weiße Pfeile markieren kondensiertes Chromatin in den Zellkernen der infizierten CAP_{sus}.

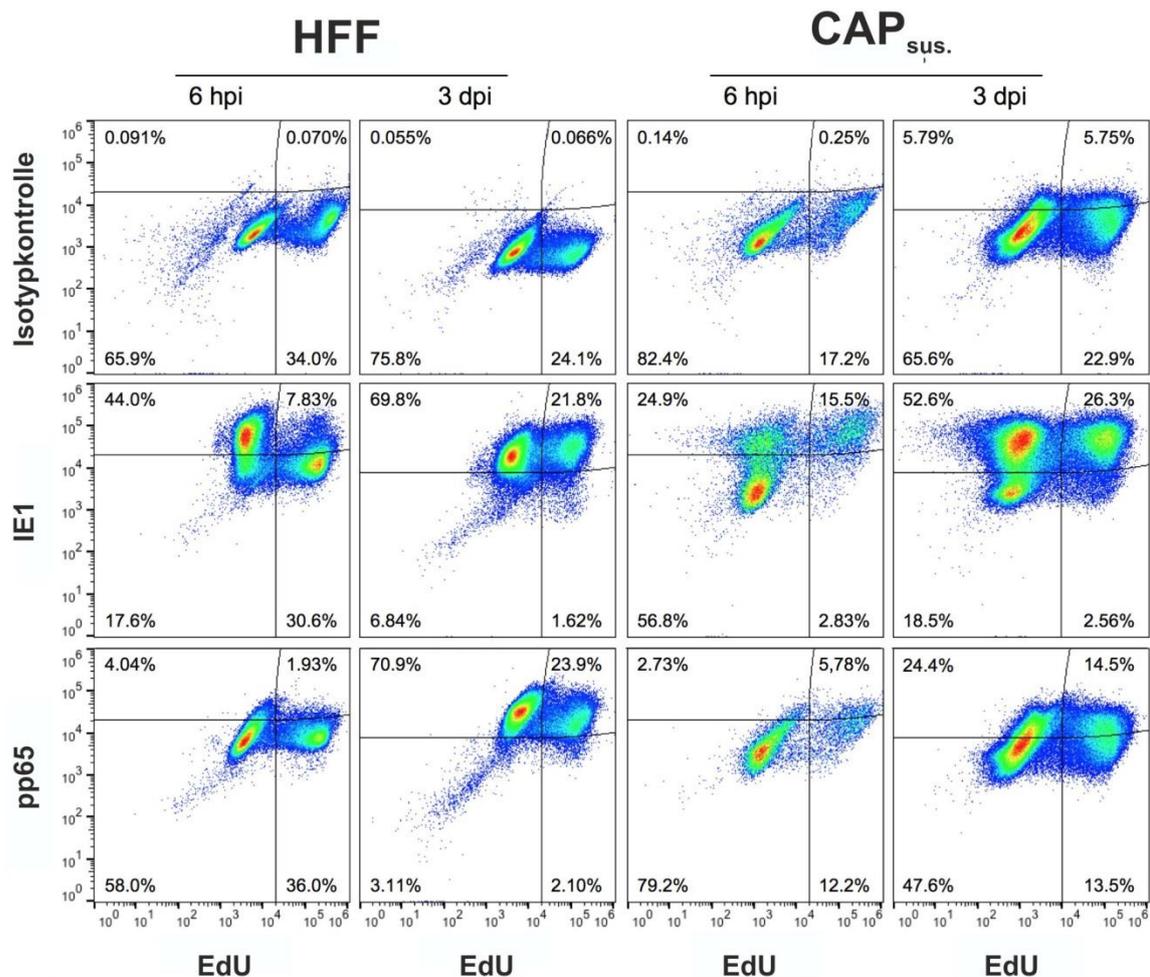


Abbildung 26: Durchflusszytometrische Analyse der viralen Proteinexpression in unterschiedlichen Zellzyklusphasen nach Infektion von CAP_{sus.} und HFF. CAP_{sus.} und HFF wurden unmittelbar vor Infektion für 30min mit EdU (25 µM CAP_{sus.}, 10 µM HFF) inkubiert, daraufhin mehrmals mit 1xPBS gewaschen und anschließend mit RV-TB40/E-BAC4ΔUL5-9 *m.o.i.* 2 infiziert. 1,5h nach Infektion wurde die Zellen mit einer 0,14 M NaCl / 0,1 M Glycin (pH 3.0)-Lösung für 1min versetzt, um verbliebenes Virus zu inaktivieren. 6h und 3d nach Infektion wurden die Zellen geerntet und mit 75% Ethanol fixiert. Die Proteinexpression der viralen Proteine wurde mit Hilfe spezifischer mAKs gegen IE1 (p63-27) und pp65 (p65-33) untersucht. Zum Ausschluss falsch positiver Ergebnisse wurde eine Fraktion der Zellen zuvor mit einer Isotypkontrolle inkubiert. Oberer, rechter Quadrant: Protein-exprimierende, S-Phase Zellen. Oberer, linker Quadrant: Protein-exprimierende Zellen, die sich in der G0/G1 bzw. G2-Phase befinden. Unterer, rechter Quadrant: S-Phase Zellen. Unterer, linker Quadrant: Zellen die sich in G0/G1 bzw. G2-Phase befinden.

4. Diskussion

HCMV ist ein ubiquitär verbreiteter Krankheitserreger, der bei Infektionen während der Schwangerschaft oder bei Geburt zu schweren, teilweise lebensbedrohenden Erkrankungen des Kindes führen kann. Hörverlust, Sehschwäche und geistige Retardierung sind hierbei wichtige, klinische Manifestationen (Pass et al., 2006; Dollard et al., 2007). Auch bei Patienten mit eingeschränkter oder unreifer Immunabwehr kann es zu schweren Verlaufsformen einer HCMV-Infektion kommen. Hierzu zählen HIV- oder Krebspatienten sowie Empfänger von soliden Organen oder hämatopoetischen Stammzellen (Dowling et al., 1976; Neiman et al., 1977; Britt, 2008; Avery, 2013; Boppana et al., 2013; Emery et al., 2013; Seo et al., 2013). Der Entwicklung einer Vakzine gegen HCMV wird daher höchste Priorität eingeräumt. Aufgrund ihrer Immunogenität stellen subvirale *Dense Bodies* (DBs) hierfür eine vielversprechende Grundlage dar (Pepperl et al., 2000; Pepperl-Klindworth et al., 2002; Mersseman et al., 2008b). *In vitro* werden diese Partikel in großen Mengen von infizierten Fibroblasten (HFF) freigesetzt und können anschließend aus Zellkulturüberstand aufgereinigt werden (Craighead et al., 1972; Irmiere et al., 1983; Roby et al., 1986; Topilko et al., 1994). Die Verwendung solcher primärer Zellen für den Herstellungsprozess eines Impfstoffes ist jedoch aus verschiedenen Gründen problematisch. Immortalisierte Zelllinien wiederum, die von Tumorgewebe abstammen oder mit adenoviralen Funktionen transformiert wurden, sind bekanntermaßen nur bedingt zur HCMV-Replikation befähigt oder gänzlich resistent gegenüber einer produktiven Infektion (Ellsmore et al., 2003; Viswanathan et al., 2011). Die in dieser Arbeit verwendete CAP-Zelllinie beruht auf primären humanen Amniozyten, die im Zuge einer routinemäßig durchgeführten Amniozentese isoliert wurden (Schiedner et al., 2000). Das bei der Amniozentese gewonnene Fruchtwasser enthält viele verschiedene Zelltypen, die sowohl mütterlichen wie auch fetalen Ursprungs sein können. Ein Teil dieser Zellen weist einen pluripotenten Charakter auf und exprimiert sowohl embryonale als auch adulte Stammzellmarker. Diese Eigenschaften lassen sie für die Bekämpfung von Krankheiten des Nervensystems besonders attraktiv erscheinen (De Coppi et al., 2007). Da Amniozyten zudem aus Überschussmaterial gewonnen werden können, stehen ihrer Verwendung zur Impfstoffproduktion kaum ethische Bedenken entgegen (Kim et al., 2014; Koike et al., 2014).

Vor Beginn dieser Arbeit waren bereits Daten publiziert die zeigten, dass *amniotic epithelial cells* (AECs) in Zellkultur mit HCMV infiziert werden können (Figuroa et al., 1978). In einer aktuellen Arbeit wurde berichtet, dass AECs aus Plazentaprobe von Schwangeren nach primärer und rezidivierender HCMV-Infektion zytoplasmatische Vesikel enthalten, die mit HCMV-Antigenen gefüllt sind (Pereira et al., 2014). Adhärenz

CAP-Zellen weisen einen Epithelzell-ähnlichen Charakter auf. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass diese Zellen von AECs abstammen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass CAP-Zellen trotz ihrer Transformation mit den adenoviralen E1-Funktionen ihre Suszeptibilität gegenüber HCMV bewahrt haben, allerdings in Zellkulturüberständen infizierter CAP-Zellen im Vergleich zu HFF wesentlich geringere Virustiter detektiert werden können.

4.1 Penetration von HCMV in CAP-Zellen

Die permissive HCMV-Infektion geht mit charakteristischen Zellveränderungen einher, die als *cytopathic effect* (CPE) bezeichnet werden. In HCMV-infizierten CAP-Zellen konnte in der Tat ein ausgeprägter CPE beobachtet werden, der dem infizierter HFF zu frühen Zeitpunkten der Infektion glich (Poncet et al., 2006). Mithilfe einer Luciferase-exprimierenden HCMV-Mutante konnte zudem gezeigt werden, dass virale Promotoren in infizierten CAP-Zellen aktiviert werden (siehe Abb. 5). Dies demonstriert, dass Adsorption und Penetration von HCMV, sowie der Transport viraler DNA in den Zellkern von CAP-Zellen unterstützt wird (Ogawa-Goto et al., 2003; Miller et al., 2009). Daraus folgt, dass CAP-Zellen Oberflächenproteine exprimieren, die als Rezeptoren für HCMV fungieren. Bisher ist jedoch unklar, ob CAP-Zellen über Membranfusion an der Zelloberfläche oder über Rezeptor-vermittelte Endozytose mit HCMV infiziert werden (Compton et al., 1992; Adler et al., 2006; Ryckman et al., 2006; Sinzger et al., 2008a; Adler et al., 2013). Aufgrund des Epithelzell-ähnlichen Charakters adhärenter CAP-Zellen wurde zunächst die Rezeptor-vermittelte Endozytose als Infektionsmechanismus für HCMV favorisiert. Obwohl der endozytotische Aufnahmemechanismus von HCMV in Endothel- bzw. Epithelzellen bisher nur ungenügend charakterisiert ist, spricht vieles für Makropinozytose als Infektionsweg in die jeweiligen Zelltypen (Smith et al., 1974; Bodaghi et al., 1999; Wang et al., 2005a; Wang et al., 2007; Sinzger et al., 2008a). Im Vorfeld der EM-Analysen wurde daher angenommen, dass sich bei erfolgreicher Penetration von HCMV in CAP-Zellen umhüllte Partikel in intrazellulären Vesikeln befinden würden. Tatsächlich waren unmittelbar nach Infektion vermehrt vesikuläre Formen im Zytoplasma von CAP_{adh.} zu sehen. Einige dieser Vesikel enthielten Strukturen, die denen umhüllter Virionen glichen. Neben diesen konnten zudem DBs, sowohl in Vesikeln als auch frei im Zytoplasma gefunden werden. Auch in CAP_{sus.} waren Virionen-ähnliche Strukturen zu sehen. Diese befanden sich aber ausschließlich im Zytoplasma der infizierten Zelle (siehe Abb. 6). Dies lässt vermuten, dass die Penetration von HCMV im Falle von CAP_{sus.} vorwiegend über Membranfusion an der Zelloberfläche erfolgt.

Interessanterweise waren CAP_{adh.} mit HCMV-Laborstämmen infizierbar. Diese Stämme sind nicht in der Lage, den pentameren Komplex aus den Glykoproteinen gH, gL und pUL128-131A auf ihrer Oberfläche zu exprimieren. Sie weisen daher *in vitro* nur ein sehr begrenztes Wirtszellspektrum auf (Wang et al., 2005a; Sinzger et al., 2008a). Neuere Studien zum Eintrittsmechanismus von HCMV legen nahe, dass der Membrankomplex gH/gL/gO die Fusion des Glykoproteins gB auf allen Zelltypen reguliert, der pentamere Komplex hingegen den Virustropismus auf eine spezifische, bisher unbekannte Weise verbreitert (Zhou et al., 2015). Im Umkehrschluss würde dies bedeuten, dass der pentamere Komplex nicht direkt an der Regulation der Fusion von gB an die Zelloberfläche beteiligt ist, sondern alternative Funktionen während Adsorption und Penetration ausübt, die den Eintritt eventuell beschleunigen. CAP-Zellen stellen daher ein attraktives Zellsubstrat dar, Pentamer-abhängige wie auch Pentamer-unabhängige Prozesse während der HCMV-Infektion zu untersuchen.

4.2 Analyse der initialen Ereignisse in CAP-Zellen nach HCMV-Infektion

Die Expression der viralen *immediate-early* (IE) -Gene ist eine Voraussetzung für die Initiation des Replikationszyklus von HCMV. Ein wichtiges Protein das von diesen Genen kodiert wird ist IE1. Zwar konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von IE1-defizienten Viren bei Infektionen mit hoher *m.o.i.* keinen Einfluss auf die Replikationsfähigkeit von HCMV in Fibroblasten hat. Im Gegensatz dazu ist IE1 jedoch bei Infektionen mit geringer *m.o.i.* entscheidend; die Infektion von Fibroblasten mit IE1-defizienten Viren resultiert hier in einer stark attenuierten Vermehrungsfähigkeit (Mocarski et al., 1996; Greaves et al., 1998; Paulus et al., 2009). Zudem begünstigt IE1, zusammen mit IE2, die transkriptionelle Aktivierung der frühen viralen Gene (Greaves et al., 1998; Gawn et al., 2002). Da IE1 in infizierten CAP-Zellen stark exprimiert wurde (siehe Abb. 11) war es eher unwahrscheinlich, dass die Limitation der Partikelfreisetzung in einer begrenzten IE-Genexpression zu suchen ist. Jedoch war unklar, ob IE1-vermittelte, antivirale Abwehrmechanismen der Wirtszelle, die für HFF beschrieben worden waren, auch in CAP-Zellen beeinflusst wurden. Im Verlauf einer produktiven Infektion von HFF verhindert IE1 unter anderem durch die Auflösung zellulärer ND10-Domänen die Anlagerung repressiver Histone an virale Promotoren. Dieser Vorgang erfolgt durch DeSUMOylierung des Gerüstproteins PML (Korioth et al., 1996; Ahn et al., 1997; Ahn et al., 1998; Wilkinson et al., 1998; Lee et al., 2004; Saffert et al., 2006). Tatsächlich war in infizierten CAP_{adh.} früh nach Infektion (5h p.i.) IE1 deutlich mit PML assoziiert (siehe Abb. 12). Einen Tag nach Infektion wiederum war IE1 gleichmäßig über

die Zellkerne der infizierten CAP_{adh.} verteilt und nahezu kein PML nachweisbar, was auf eine vollständige Dispersion des Gerüstproteins hindeutete. Der hier beobachtete Phänotyp entsprach dem, der in den zur Kontrolle mitgeführten HFF gefunden wurde. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass die immunesvasiven Funktionen von IE1 auch in CAP_{adh.} wirksam sind.

Diese Ergebnisse zeigen zusammengefasst, dass weder ein Block in der IE1-Genexpression noch eine fehlende Auflösung von ND10-Domänen für die eingeschränkte Produktivität von CAP-Zellen gegenüber einer HCMV-Infektion verantwortlich sind. Es ist allerdings unklar, ob in CAP-Zellen tatsächlich die Besetzung des HCMV-Genoms mit repressivem Chromatin effizient verhindert wird. Untersuchungen dieser Phänomene, etwa über CHIP-Analysen müssen weiterführenden Arbeiten vorbehalten bleiben.

4.3 Genexpression früher und später viraler HCMV-Proteine in CAP-Zellen

Auf die Expression der IE-Gene folgt kaskadenartig die Expression der frühen Gene des HCMV. Ein Teil der frühen Proteine ist in essentieller Weise an viraler DNA-Synthese, Genomspaltung und Genomverpackung beteiligt. Zudem wurde beschrieben, dass andere frühe Proteine die zelluläre und extrazelluläre Umgebung in einer Weise beeinflussen, dass die für virale Genexpression und DNA-Replikation optimalen Bedingungen geschaffen werden (White et al., 2007). Dies geschieht beispielsweise durch Beeinflussung des Zellzyklus oder durch Interferenz mit der Antigenpräsentation. Mithilfe einer Mutante, die EGFP unter Kontrolle des frühen UL16-Promotors von HCMV exprimiert (Digel et al., 2006), konnte gezeigt werden, dass ein früher HCMV-Promotor in infizierten CAP-Zellen aktiviert wird. Darüber hinaus war die Expression von EGFP in nahezu allen infizierten Zellen nachweisbar. Dies kann als Hinweis gewertet werden, dass in infizierten CAP-Zellen die frühe Phase der viralen Genexpression unterstützt wird.

Auch die Verwendung einer weiteren rekombinanten Virusmutante, in der die Luciferase-Expressionskassette unter Kontrolle des frühen HCMV UL84-Promotors ist, zeigte eindeutig, dass ein weiterer früher Promotor im Zuge einer HCMV-Infektion sowohl in CAP_{adh.} als auch in CAP_{sus.} aktiviert wird (siehe Abb. 14a, b). Hier waren jedoch erste Unterschiede zu beobachten. CAP_{sus.} zeigten im Vergleich zu CAP_{adh.} einen stärkeren Abfall der Enzymaktivität im Laufe der Infektion. Da UL84 ein wichtiger Faktor für die Initiierung der lytischen DNA-Replikation und zudem für eine produktive Infektion von

HCMV essentiell ist (Pari et al., 1993; Sarisky et al., 1996; Xu et al., 2002; Dunn et al., 2003; Xu et al., 2004), liegt nahe, dass die fehlende Produktion von Tochterviren in CAP_{sus.}, zumindest teilweise durch Limitationen in der Expression von frühen Proteinen begründet ist. Im Gegensatz hierzu fand sich in CAP_{adh.} eine deutliche Aktivierung des UL84-Promotors.

Auch konnte die Synthese von pUL44 in CAP-Zellen nachgewiesen werden. In CAP_{adh.} waren zudem nukleäre Strukturen zu beobachten, die als Replikationskompartimente identifiziert werden konnten (siehe Abb. 15). All dies zeigte, dass CAP-Zellen die Initiation der HCMV-Genomreplikation grundsätzlich unterstützen. Allerdings war auch hier die Rate der Protein-Synthese deutlich niedriger als in HFF. Die prozessive Untereinheit pUL44 bildet zusammen mit fünf weiteren hoch konservierten Proteinen den viralen Polymerase-Komplex, dessen Bildung für die Initiation der viralen DNA-Replikation nach HCMV-Infektion essentiell ist (Colberg Poley et al., 2013). Es ist daher zu vermuten, dass aufgrund der geringeren Proteinsynthese ein limitierender Faktor der HCMV-Infektion in CAP-Zellen in der Tat in der Effizienz der Initiation der viralen DNA-Synthese zu suchen ist.

Das in der *early-late* Phase abundant gebildete Phosphoprotein pp65, welches Hauptbestandteil des viralen Teguments von Virionen und DBs ist, konnte sowohl in CAP_{adh.} als auch in CAP_{sus.} nachgewiesen werden. In CAP_{sus.} konnte zudem die für eine produktive Infektion wichtige Veränderung der pp65-Lokalisation im Laufe der Infektion beobachtet werden. Zu Beginn war pp65 hauptsächlich im Zellkern verteilt, während zu späteren Infektionszeitpunkten eine zytoplasmatische Lokalisation überwog (siehe Abb. 16). Es wurde beschrieben, dass pp65 für den korrekten Zusammenbau des viralen Teguments in neu synthetisierte Virionen notwendig ist (Chevillotte et al., 2009; Reyda et al., 2014b). Der Nachweis von pp65 legt zudem nahe, dass es zu einer Expression weiterer früher Proteine gekommen ist.

In der späten Phase der Infektionskaskade werden Proteine synthetisiert, die für *Assembly* und *Egress* der Tochterviren notwendig sind (Kalejta, 2008b). Ein Vertreter der späten HCMV-Proteine ist das Tegumentprotein pp28 (Meyer et al., 1988; Varnum et al., 2004), welches an der Umhüllung von Virionen beteiligt ist (Seo et al., 2007). Daher liegt nahe, dass es für die HCMV-Morphogenese und somit für die Produktion infektiöser Viren essentiell ist (Seo et al., 2006; Liu et al., 2009). Seine Expression wurde beispielhaft für späte Genexpression in HCMV-infizierten CAP-Zellen herangezogen. Die pp28-Proteinsynthese konnte in der vorliegenden Arbeit nur in CAP_{adh.}, nicht jedoch in CAP_{sus.} nachgewiesen werden. Selbst in CAP_{adh.} war die Zahl der pp28-exprimierenden Zellen begrenzt. Dieses Ergebnis war nicht unerwartet, da die abundante Expression später Virusproteine in essentieller Weise von der Effizienz der viralen Genomreplikation

abhängt. Es liegt nahe, wenngleich es in dieser Arbeit nicht untersucht wurde, dass auch andere späte Proteine in HCMV-infizierten CAP-Zellen nur begrenzt exprimiert werden. Zusammenfassend zeigen diese Experimente, dass in CAP-Zellen frühe und späte Genexpression des HCMV grundsätzlich möglich ist; gleichwohl wurden Hinweise erhalten, dass insbesondere die Effizienz der späten Genexpression eingeschränkt und damit für die Produktion von Tochterviren limitierend ist. Hier sind jedoch weiterführende Analysen der Expression später viraler Proteine, beispielsweise durch quantitative Massenspektrometrie notwendig, um ein detaillierteres Bild über die Vorgänge während der viralen Morphogenese in CAP-Zellen zu erhalten.

4.4 Replikation viraler DNA in HCMV-infizierten CAP_{adh.} und CAP_{sus.}

In CAP_{sus.} konnte nur in sehr begrenztem Ausmaß HCMV-Genomreplikation nachgewiesen werden. Ein Grund hierfür dürfte in der geringen Expression von UL84 liegen. Es ist jedoch anzunehmen, dass auch weitere Proteine, die für die Genomreplikation wichtig sind und hier nicht untersucht wurden nur in geringem Umfang exprimiert werden. Es ist wahrscheinlich, dass die begrenzte Expression von Proteinen des Polymerase-Komplexes von HCMV die permissive Vermehrung des Virus in CAP_{sus.} verhindern. Einschränkend muss jedoch bemerkt werden, dass bei der Analyse der viralen DNA-Vermehrung durch qPCR Genomkopien pro Zelle bestimmt wurden. Gleichzeitig war während der Analysen der Eindruck entstanden, dass sich uninfizierte CAP_{sus.} deutlich schneller teilten als infizierte Zellen der Kultur. Da für die Berechnung der Genomkopien immer alle Zellen als Bezug herangezogen wurden, kann hier eine zu niedrige Einschätzung der Genomzahl nicht ausgeschlossen werden. Somit ist zu beachten, dass die tatsächliche Effizienz der viralen Genomreplikation in CAP_{sus.} durch diese Art der Analyse eventuell unterschätzt wird. Aber selbst unter Berücksichtigung dieses Umstandes muss festgestellt werden, dass die HCMV-Genomreplikation von CAP_{sus.} unter den gewählten Bedingungen nur unzureichend unterstützt wird.

Im Gegensatz zu CAP_{sus.} war in CAP_{adh.} virale Genomreplikation nachweisbar. Jedoch blieb die Rate der DNA-Neusynthese deutlich hinter der von HFF zurück. Es ist anzunehmen, dass ein wesentlicher Faktor für die begrenzte Produktivität von CAP_{adh.} hier zu suchen ist. Ähnlich wie bei der späten Genexpression wird es nötig sein, durch quantitative Analyse die Expression der essentiellen Komponenten des viralen Polymerase-Komplexes zu untersuchen um zu klären, auf welcher Ebene die virale DNA-Replikation begrenzt ist und welche Möglichkeiten entwickelt werden können, um die Effizienz zu steigern.

4.5 Analyse der Morphogenese viraler Partikel in HCMV-infizierten CAP-Zellen

Die Partikelmorphogenese von HCMV wird von CAP_{adh.} vollständig unterstützt. Allerdings konnten nur in einer begrenzten Anzahl der Zellen virale Partikel mittels TEM nachgewiesen werden. Eine Erklärung hierfür wäre, dass nur eine Subpopulation der CAP-Zellen die vollständigen Prozesse der viralen Partikelmorphogenese unterstützt. Da es sich bei CAP-Zellen jedoch um eine klonale Zelllinie handelt, sind genetische Unterschiede als Begründung für den begrenzten Partikelnachweis mittels TEM sehr unwahrscheinlich. Eine alternative Erklärung ergibt sich aus der Vorstellung, dass initial nicht infizierte Zellen im Verlaufe der Infektion einen deutlichen Wachstumsvorteil hatten und daher zum Zeitpunkt der TEM-Analyse zahlenmäßig überwogen. Weiterhin ist möglich, dass aufgrund der begrenzten Synthese viraler Genome im Rahmen der Replikation in CAP_{adh.} nur in wenigen Zellen ausreichende Mengen später, strukturbildender Proteine für die virale Morphogenese verfügbar waren; dies würde bedeuten, dass die meisten Zellen abortiv infiziert waren und nicht bis zur Phase der Partikelmorphogenese gelangten. Weitere Untersuchungen, beispielsweise mittels *live-cell imaging* sind notwendig, um zwischen diesen Alternativen zu unterscheiden.

In den Zellen, in denen virale Partikel gefunden wurden, konnten sowohl B- als auch reife, DNA-haltige, C-Kapside im Zellkern nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu waren in infizierten CAP_{sus.} insgesamt weniger virale Partikel und zudem ausschließlich B-Kapside sichtbar. Dieses Ergebnis entsprach der Erwartung, da in CAP_{sus.} kaum oder keine virale DNA-Replikation nachgewiesen worden war (vgl. Abb. 18). Es liegt nahe, dass die geringe Menge an viralen Genomen während der Partikelmorphogenese der Grund für die ausschließliche Bildung von B-Kapsiden ist.

Im Zytoplasma infizierter CAP_{adh.} waren zusätzlich vesikuläre bzw. membranöse Strukturen zu beobachten, die mit hoher Wahrscheinlichkeit dem *viral Assembly Compartment* (vAC) entsprechen (Sanchez et al., 2000a; Das et al., 2007). In diesen Strukturen befanden sich Partikel, die Virionen glichen, welche im Zytoplasma infizierter HFF zu finden sind (siehe Abb. 20). In CAP_{sus.} dagegen waren weder membranöse Strukturen noch Virionen zu finden. Neben Virionen waren im Zytoplasma infizierter CAP_{adh.} Strukturen vorhanden, die denen von DBs in HFF ähnlich sind. Die Anzahl dieser Partikel in beiden Präparaten war relativ niedrig. Dies ist durch den Virusstamm begründet, der für die Infektion eingesetzt wurde; Abkömmlinge des Stammes TB40/E bilden bekannter Maßen in infizierten HFF nur eine geringe Zahl an DBs, die deutlich unter der Zahl nach Infektionen mit einem Laborstamm liegt.

Weiterführende Experimente belegten, dass DBs aus TowneUL130rep-infizierten CAP_{adh.} freigesetzt werden (siehe Abb. 21). Jedoch blieben die Ausbeuten dieser Partikel hinter denen, die aus infizierten HFF aufgereinigt wurden zurück. Mögliche Gründe hierfür sind die bereits erwähnten Kulturbedingungen infizierter CAP_{adh.} aufgrund derer nicht ausgeschlossen werden kann, dass zum Zeitpunkt der Analyse hauptsächlich nicht infizierte Zellen beobachtet wurden. Hier müssten virale Mutanten zum Einsatz kommen, die beispielsweise eine Resistenz gegenüber dem Zellgift Puromycin vermitteln. Durch Zugabe dieses Toxins in das Kulturmedium würden gezielt infizierte Zellen im Wachstum bevorzugt werden. Zusammengefasst zeigen die Resultate, dass der komplizierte Prozess der Partikelzusammensetzung in infizierten CAP_{adh.} in einer koordinierten Weise abläuft.

4.6 Freisetzung von Nachkommen-Viren nach Infektion mit HCMV

Initiale Experimente zeigten, dass HCMV-infizierte CAP_{adh.} infektiöse Viruspartikel in den Zellkulturüberstand freisetzen und es zudem zu einer Akkumulation dieser Partikel in Abhängigkeit von der Zeit nach Infektion kommt (siehe Abb. 8b, c). Die Mengen viraler DNA, die im Zellkulturüberstand infizierter CAP_{adh.} gefunden wurden, waren zudem nur etwa zehnfach niedriger als die in den Kontrollproben (HFF). Überraschenderweise war die Infektiosität der freigesetzten Viren aus infizierten CAP_{adh.} jedoch limitiert; der Titer war um etwa 3 Logstufen niedriger als der, welcher nach Infektion von Fibroblasten bestimmt wurde (siehe Abb. 10). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die Mehrzahl der freigesetzten Viruspartikel nicht infektiös war. Eine solch hohe Partikel/Infektionsrate kann dann entstehen, wenn zwar virale DNA in Partikel verpackt wird, gleichzeitig die Partikelreifung aber unvollständig bleibt. Die freigesetzten Virionen sind daraufhin in hohem Maße defekt und können nur begrenzt neue Zellen infizieren. Alternativ kann es durch die infektionsbedingte Zelllyse zur Freisetzung von nicht-verpackter Virus-DNA kommen, die dann zu einem hohen Wert bei der quantitativen Bestimmung der Virusgenome im Kulturüberstand führt. Schließlich kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass Virionen aus CAP-Zellen grundsätzlich eine geringe Infektiosität gegenüber Fibroblasten aufweisen und sich dadurch der geringe Titer in der Analyse auf HFF ergab.

Neben der begrenzten Infektion von HFF durch Virusüberstand infizierter CAP-Zellen zeigte sich auch in der CAP-Zellkultur selbst keine Tendenz zur Ausbreitung der Infektion. Zwar waren die Zellen initial mit Kulturüberständen aus HFF gut infizierbar, es konnten aber im weiteren Verlauf keine sekundären Infektionsereignisse beobachtet

werden. So führten die Infektionen mit einer EGFP-exprimierenden Variante von HCMV zu keiner Ausbreitung in CAP-Kulturen bei täglicher, mikroskopischer Inspektion. Nach mehrfacher Passage dieser infizierten Zellen verlor sich das EGFP-Signal gänzlich (Daten nicht gezeigt). Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass für eine Re-Infektion deutlich mehr infektiöse Partikel pro Zelle benötigt werden, als tatsächlich aus infizierten CAP-Zellen freigesetzt werden. Dies ist mit der Erkenntnis vereinbar, dass die Partikel/Infektionsrate in Endothel- bzw. Epithelzellen im Vergleich zu HFF generell höher ist und diese sich zudem initial schwerer mit HCMV infizieren lassen (Ryckman et al., 2006). Hier ist ein Zusammenhang mit dem Grad der Expression des Glykoprotein-Komplexes aus gH/gL und pUL128-131A auf der Oberfläche der Virionen denkbar. Kürzlich durchgeführte massenspektroskopische Experimente sprechen tatsächlich für eine verringerte Menge dieser Glykoproteine auf der Oberfläche von DBs, die aus infizierten CAP-Zellen aufgereinigt wurden (Daten nicht gezeigt). Für eine abschließende Aufklärung der Gründe für die begrenzte Freisetzung infektiöser Viren aus CAP-Zellen sind weitere Untersuchungen, beispielsweise durch Proteomanalysen der freigesetzten Partikel und durch DNase-Behandlung der Proben zur Abreicherung freier Virus-DNA erforderlich.

Neben einer fehlenden Ausbreitung der HCMV-Infektion in CAP-Zellkulturen durch freigesetzte Viren wurde auch keine Herdbildung beobachtet. Dies spricht dafür, dass auch die Übertragung über Zellkontakt (*cell-to-cell spread*) in CAP-Zellen nicht möglich ist. Die Mechanismen, die zur Herdbildung in HCMV-infizierten Zellkulturen führen, sind bislang nur unzureichend geklärt. Beschrieben ist, dass die Zell-assoziierte Virusausbreitung in Endothel- bzw. Epithelzellen durch Fehlen des trimeren Glykoprotein-Komplexes (gH/gL/gO) nicht beeinträchtigt wird (Jiang et al., 2008; Wille et al., 2010). Auf der anderen Seite korreliert die Expression des pentameren Glykoprotein-Komplexes aus gH/gL/pUL128-131A direkt mit der Fähigkeit des Virus den Eintritt sowie die Zell-vermittelte Virusausbreitung in Endothel- bzw. Epithelzellen zu vermitteln (Murrell et al., 2013). Des Weiteren konnten Scrivano et al. zeigen, dass infizierte Endothelzellen vermehrt Viruspartikel freisetzen, die wenig bis keinen pentameren Komplex auf ihrer Oberfläche tragen (Scrivano et al., 2011) und dass dieser Umstand negativ mit der Fähigkeit zur Zell-assoziierte Virusausbreitung korreliert (Murrell et al., 2013). Dieser Befund hängt mit der Beschreibung unterschiedlicher Zelltropismen der aus infizierten Endothel- bzw. Epithelzellen und Fibroblasten freigesetzten viralen Nachkommen zusammen (Scrivano et al., 2011; Adler, 2015). Eine entsprechende Hypothese lässt sich auch für die hier beschriebenen Ergebnisse der Infektion von CAP-Zellen aufstellen. Infizierte CAP-Kulturen setzen möglicherweise nur solche Virionen frei, die wenig bis gar keinen Glykoprotein-Komplex aus gH/gL/pUL128-131A auf ihrer

Oberfläche tragen und daraus resultierend die erneute Infektion von CAP-Zellen bzw. die Zell-assoziierte Virusausbreitung nur eingeschränkt oder gar nicht möglich ist. Dem widerspricht auch nicht die Beobachtung, dass Pentamer-defiziente Laborstämme CAP-Zellen mit geringer Effizienz primär infizieren können, da bislang weitgehend unbekannt ist, welche Funktionen über die Interaktionen des pentameren bzw. trimeren Komplexes vermittelt werden. Weiterhin zeigen publizierte Daten, dass der *cell-to-cell spread* in HCMV-infizierten Amniozytenkulturen nur sehr begrenzt stattfindet und zudem keine Zelllyse bis Tag 12 nach Infektion beobachtet werden kann (Matsunaga et al., 2013). Dies kann unter Umständen bedeuten, dass die sowohl im Vergleich zur Freisetzung aus HFF geringeren Virustiter als auch der fehlende *cell-to-cell spread* in infizierten CAP-Zellkulturen dem genetischen Hintergrund der verwendeten Zelllinie geschuldet ist. Sollte dies der Fall sein, wäre eine Optimierung der Freisetzung und Virusausbreitung nur schwer möglich.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass CAP_{adh.} HCMV-Tochternviren freisetzen, dass aber weitere Untersuchungen zur Analyse der HCMV-Morphogenese sowie der Expression viraler Oberflächenproteine notwendig sind. Detailliertere Untersuchungen zum intrazellulären Transport viraler Proteine, ultrastrukturelle Analysen zur Morphogenese viraler Partikel sowie massenspektroskopische Analysen der Synthese viraler Oberflächenproteine werden klären, auf welcher Stufe die Virusvermehrung in infizierten CAP-Zellen von der in HFF abweicht und welche Möglichkeiten zur Optimierung bestehen.

4.7 Analyse der aus HCMV-infizierten CAP_{adh.} freigesetzten Viruspartikel

Nach Aufreinigung von Viruspartikeln aus dem Kulturüberstand infizierter CAP_{adh.} zeigten sich im Gradienten die drei typischen Banden für NIEPs, Virionen und DBs. Im Proteingel konnte zudem das bekannte Bandenmuster beobachtet werden, das auch in Kontrollpartikeln aus HFF zu sehen war. Diese Resultate belegen, dass trotz der limitierten Freisetzung infektiöser Partikel aus CAP-Zellen offensichtlich eine regelgerechte Morphogenese durchlaufen wird. Zudem lieferte die im Bandenmuster dominante pp65-Bande einen Hinweis darauf (siehe Abb. 21), dass neben Virionen auch DB-ähnliche Partikel aus infizierten CAP-Zellen freigesetzt werden, da pp65 der Hauptbestandteil des viralen Teguments dieser Partikel ist (Varnum et al., 2004; Reyda et al., 2014a, b). Jedoch konnten diese Partikel nur in geringer Menge aufgereinigt werden. Für die Produktion von DBs zur Impfstoff-Herstellung aus CAP-Zellen besteht offensichtlich an dieser Stelle Optimierungsbedarf. Ein erstes Ziel ist es hier, die

limitierenden Faktoren der Partikelmorphogenese zu identifizieren um in einem zweiten Schritt Strategien zur Verbesserung der „Ausbeute“ an DBs zu entwickeln.

4.8 Einfluss der adenoviralen Proteine E1A und E1B auf die HCMV-Infektion in CAP-Zellen

HCMV kann seine Wirtszellen in jeder Zellzyklusphase infizieren. Die IE-Genexpression sowie die anschließende Initiierung der Genomreplikation sind jedoch nur in der G₀- und frühen G₁-Phase der infizierten Zelle möglich (Salvant et al., 1998; Fortunato et al., 2002; Spector, 2015). Befindet sich die Wirtszelle zum Zeitpunkt der Infektion in einer späteren Zellzyklusphase, verzögert sich die virale Genexpression bis zum Zeitpunkt der Zellteilung und dem erneutem Eintritt in die G₁-Phase (Salvant et al., 1998; Fortunato et al., 2002). Das virale Tegumentprotein pp150 dient als Sensor für ungünstig hohe Spiegel an Cyclin A, welche vor allen Dingen in der S-Phase vorherrschen. Der molekulare Mechanismus wie pp150 diese Funktion erfüllt ist bisher jedoch unbekannt (Bogdanow et al., 2013). Sobald die infizierte Zelle den G₁/S-Phase-Übergang erreicht hat, inhibiert das virale IE2-Protein den Eintritt in spätere Zellzyklusphasen und somit die Synthese zellulärer DNA (Wiebusch et al., 1999; Petrik et al., 2006). Auf der anderen Seite tragen die adenoviralen Proteine E1A und E1B zu einer Regulation des Zellzyklus hin zur S-Phase bei. E1A zum Beispiel inaktiviert Komponenten der Retinoblastoma-Proteinfamilie, wodurch die Inhibition des Transkriptionsfaktors E2F aufgehoben wird. Dieser wiederum aktiviert unter anderem Gene, die an der zellulären DNA-Replikation beteiligt sind. Jedoch wird durch E2F zudem der zelluläre ARF-Promotor aktiviert. Das resultierende Protein inhibiert wiederum die Funktionen des Onkoproteins MDM2, welches eine E3-Ligase ist und den Tumorsuppressor p53 mit Hilfe von Ubiquitin für den proteasomalen Abbau markiert. Durch die Inhibition von MDM2 kommt es normalerweise zu einer Stabilisierung von p53 und daraus resultierend zu einem Zellzyklusarrest bzw. zur Apoptose der Zelle. Dies wird jedoch im Falle der Adenoviren durch das Protein E1B im Falle von HCMV durch IE2 verhindert, die auf unterschiedliche Weise die Funktionen von MDM2 übernehmen und den Tumorsuppressor p53 für den proteasomalen Abbau markieren (McCormick, 2001; Ben-Israel et al., 2002; Cinatl et al., 2004). Schlussendlich stimulieren die adenoviralen Proteine den Eintritt der Wirtszelle in die S-Phase wohingegen HCMV das Gegenteil bewirkt und für eine produktive Infektion einen Zellzyklusarrest induziert.

Interessanterweise sind zumindest CAP_{adh.} geeignet, die virale DNA-Replikation zu initiieren und infektiöse Nachkommen zu produzieren. Bei anderen E1A/E1B-transformierten Zellen, wie zum Beispiel HEK293 ist dies nicht der Fall (siehe Abb. 18;

(Ellsmore et al., 2003; Viswanathan et al., 2011)). Eine mögliche Erklärung hierfür liefern dabei die Unterschiede der jeweiligen E1A-Spiegel. In HEK293 waren diese annähernd doppelt so hoch wie die in den jeweiligen CAP-Zellproben. Es liegt daher nahe anzunehmen, dass sich die adenoviralen E1-Proteine tatsächlich inhibierend auf eine produktive HCMV-Infektion auswirken und dass die Unterschiede zwischen HEK293 und CAP-Zellen eine, wenn auch begrenzte HCMV-Replikation in CAP_{adh.} erklären. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass die HCMV-Infektion in CAP-Zellen die Expression von E1A stimuliert (siehe Abb. 23). Es ist daher wahrscheinlich, dass die bisher noch zum Teil unbekanntenen inhibierenden Effekte der adenoviralen Proteine auf die Virusvermehrung durch eine HCMV-Infektion sogar verstärkt werden.

Die Verteilung der Zellzyklusphasen HCMV-infizierter CAP_{adh.} war mit der von infizierten HFF vergleichbar. Im Gegensatz hierzu fand sich sowohl in CAP_{sus.} wie auch in HEK293 ein deutlich anderes Verteilungsmuster. Hier war zu einem gegebenen Zeitpunkt ein Großteil der Zellen in Zellzyklusphasen, die für die HCMV-Infektion als ungünstig angesehen werden müssen (siehe Abb. 24). Da die HCMV-Infektion in CAP_{adh.} produktiv verläuft während sie in CAP_{sus.} nur sehr ineffizient und in HEK293 gar nicht möglich ist, ist es wahrscheinlich, dass einer der limitierenden Faktoren der adenoviralen E1A/E1B-Proteinen tatsächlich in der ungünstigen Verteilung der Zellzyklusphasen begründet ist. Dennoch scheinen noch weitere, bisher unbekannte Faktoren die HCMV-Infektion in CAP-Zellen zu inhibieren. CAP_{adh.} zeigten beispielsweise trotz ihrer günstigen Zellzyklusphasen zu Beginn der Infektion im Vergleich zu HFF eine deutlich verminderte Permissivität. Mögliche Gründe hierfür wären die fehlende oder unzureichende Expression viraler Proteine, die für die Replikation und anschließende Morphogenese notwendig sind.

Die Ergebnisse in infizierten CAP_{sus.} wiederum deuten darauf hin, dass neben den bereits erwähnten, möglichen Limitationen, die HCMV-Infektion hier zu einem nur unvollständigen Zellzyklusblock führt. Eine Erklärung dafür wäre eine verstärkte, E1A-vermittelte Cyclin A2-Synthese. Nach Beginn der lytischen HCMV-Genexpression kann ein Überschuss an Cyclin A2 zum Metaphase-Arrest der Zelle führen. Nachfolgend kommt es zu Abweichungen in der Spindelformation und letztendlich zur Instabilität und darauffolgender Kondensation der Chromosomen (Eifler et al., 2014). Normalerweise wird dies von HCMV über die viralen Proteine pp150 und pUL21a verhindert, die auf unterschiedliche Weise einen Zellzyklus-Arrest der infizierten Zelle bewirken und somit niedrige Cyclin A-CDK-Level zum Zeitpunkt der Infektion gewährleisten (Oduro et al., 2012; Bogdanow et al., 2013; Caffarelli et al., 2013; Eifler et al., 2014). Möglicherweise sind die viralen Proteine pp150 und pUL21a in CAP_{sus.}, anders als in HFF, nur eingeschränkt funktionsfähig und in Folge dessen kommt es zu einem verstärkten Eintritt

in die S-Phase und darauf folgender Mitose. Hier bedarf es weiterer Analysen, die das Zusammenspiel der viralen Proteinen und des Cyclins A2 in infizierten CAP-Zellen näher untersuchen. Hieraus könnten sich in der Folge Ansatzpunkte für eine Verbesserung der Infektionsbedingungen für HCMV ergeben.

4.9 Resümee

CAP-Zellen sind für eine effiziente und reproduzierbare Expression von Proteinen einsetzbar (Schiedner et al., 2008; Fischer et al., 2012). Zudem stellen sie ein Wirtszellsubstrat für die Vermehrung von Influenza-Viren (Genzel et al., 2013; Genzel et al., 2014; Genzel, 2015) sowie für RSV dar (Vlecken et al., 2013). Infektionen mit den Polio-Viren 1-3 zeigen annehmbare Virustiter (Vlecken et al., 2013). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass HCMV in CAP-Zellen replizieren kann, wenngleich die Effizienz der Virusvermehrung deutlich hinter der in HFF zurückbleibt. Bemerkenswerterweise setzen HCMV-infizierte CAP-Zellen zudem DBs in den Zellkulturüberstand frei. Diese subviralen Partikel stellen aufgrund ihrer außergewöhnlichen Immunogenität einen attraktiven Kandidaten für die Entwicklung eines HCMV-Impfstoffes dar (Pepperl et al., 2000; Plotkin et al., 2013; Sauer et al., 2013). CAP-Zellen stellen daher ein attraktives Zellsubstrat für die Impfstoffentwicklung gegen HCMV dar. Für die Produktion von HCMV-Impfstoffen auf dieser Zelllinie, die eine hohe Ausbeute voraussetzt, sind jedoch noch weitere Optimierungsarbeiten notwendig. Die hier vorgestellte Arbeit liefert grundlegende Erkenntnisse für eine solche Optimierung und stellt darüber hinaus ein ausgesprochen attraktives Zellsystem vor, in dem weiterführende Untersuchungen zur Wechselwirkung von HCMV mit Amniozyten, einem wichtigen Zelltyp im Rahmen der kongenitalen Infektion durchgeführt werden können.

5. Literaturverzeichnis

- Adler, B. A Viral Pilot for HCMV Navigation? *Viruses*, 7, 7, **2015**, 3857-3862
- Adler, B.; Scrivano, L.; Ruzcics, Z.; Rupp, B.; Sinzger, C. and Koszinowski, U. Role of human cytomegalovirus UL131A in cell type-specific virus entry and release. *J Gen Virol*, 87, 9, **2006**, 2451-2460
- Adler, B. and Sinzger, C. Cytomegalovirus Interstrain Variance in Cell Type Tropism. In *Cytomegaloviruses from molecular pathogenesis to intervention*. Reddehase, M. J., Caister Academic Press: Norfolk, **2013**, 297-321
- Adler, S. P. Immunoprophylaxis against cytomegalovirus disease. *Scand J Infect Dis Suppl*, 99, **1995**, 105-109
- Adler, S. P.; Hempfling, S. H.; Starr, S. E.; Plotkin, S. A. and Riddell, S. Safety and immunogenicity of the Towne strain cytomegalovirus vaccine. *Pediatr Infect Dis J*, 17, 3, **1998**, 200-206
- Adler, S. P. and Nigro, G. Findings and conclusions from CMV hyperimmune globulin treatment trials. *J Clin Virol*, 46 Suppl 4, **2009**, 54-57
- Ahmed, S. A.; Al-Joudi, F. S.; Zaidah, A. W.; Roshan, T. M.; Rapiaah, M.; Abdullah, Y. M. and Rosline, H. The prevalence of human cytomegalovirus seropositivity among blood donors at the Unit of Blood Transfusion Medicine, Hospital Universiti Sains Malaysia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 37, 2, **2006**, 294-296
- Ahn, J. H.; Brignole, E. J., 3rd and Hayward, G. S. Disruption of PML subnuclear domains by the acidic IE1 protein of human cytomegalovirus is mediated through interaction with PML and may modulate a RING finger-dependent cryptic transactivator function of PML. *Mol Cell Biol*, 18, 8, **1998**, 4899-4913
- Ahn, J. H. and Hayward, G. S. The major immediate-early proteins IE1 and IE2 of human cytomegalovirus colocalize with and disrupt PML-associated nuclear bodies at very early times in infected permissive cells. *J Virol*, 71, 6, **1997**, 4599-4613
- Alam, J. and Cook, J. L. Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. *Anal Biochem*, 188, 2, **1990**, 245-254
- Albarino, C. G.; Ghiringhelli, P. D.; Posik, D. M.; Lozano, M. E.; Ambrosio, A. M.; Sanchez, A. and Romanowski, V. Molecular characterization of attenuated Junin virus strains. *J Gen Virol*, 78, 7, **1997**, 1605-1610
- Anders, D. G.; Kerry, J. A. and Pari, G. S. DNA synthesis and late viral gene expression. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Arvin, A., Campadelli-Fiume, G., Mocarski, E., Moore, P. S., Roizman, B., Whitley, R. and Yamanishi, K.: Cambridge, **2007**, 295-310
- Andreoni, M.; Faircloth, M.; Vugler, L. and Britt, W. J. A rapid microneutralization assay for the measurement of neutralizing antibody reactive with human cytomegalovirus. *J Virol Methods*, 23, 2, **1989**, 157-167
- Audsley, J. M. and Tannock, G. A. Cell-based influenza vaccines: progress to date. *Drugs*, 68, 11, **2008**, 1483-1491
- Avery, R. K. Clinical Cytomegalovirus Research: Thoracic Organ Transplantation In *Cytomegaloviruses from molecular pathogenesis to intervention*. Reddehase, M. J., Caister Academic Press: Norfolk, 2, **2013**, 286-300
- Barrett, P. N.; Portsmouth, D. and Ehrlich, H. J. Developing cell culture-derived pandemic vaccines. *Curr Opin Mol Ther*, 12, 1, **2010**, 21-30
- Battista, M. C.; Bergamini, G.; Boccuni, M. C.; Campanini, F.; Ripalti, A. and Landini, M. P. Expression and characterization of a novel structural protein of human cytomegalovirus, pUL25. *J Virol*, 73, 5, **1999**, 3800-3809
- Beck, M.; Welsz-Malecek, R.; Mesko-Prejac, M.; Radman, V.; Juzbasic, M.; Rajninger-Miholic, M.; Prisljin-Musklic, M.; Dobrovsak-Sourek, V.; Smerdel, S. and Stainer, D. W. Mumps vaccine L-Zagreb, prepared in chick fibroblasts. I. Production and field trials. *J Biol Stand*, 17, 1, **1989**, 85-90

- Becke, S.; Fabre-Mersseman, V.; Aue, S.; Auerochs, S.; Sedmak, T.; Wolfrum, U.; Strand, D.; Marschall, M.; Plachter, B. and Reyda, S. Modification of the major tegument protein pp65 of human cytomegalovirus inhibits virus growth and leads to the enhancement of a protein complex with pUL69 and pUL97 in infected cells. *J Gen Virol*, 91, 10, **2010**, 2531-2541
- Beersma, M. F.; Wertheim-van Dillen, P. M. and Feltkamp, T. E. The influence of HLA-B27 on the infectivity of cytomegalovirus for mouse fibroblasts. *Scand J Rheumatol Suppl*, 87, **1990**, 102-103
- Beersma, M. F.; Wertheim-van Dillen, P. M.; Geelen, J. L. and Feltkamp, T. E. Expression of HLA class I heavy chains and beta 2-microglobulin does not affect human cytomegalovirus infectivity. *J Gen Virol*, 72, 11, **1991**, 2757-2764
- Ben-Israel, H. and Kleinberger, T. Adenovirus and cell cycle control. *Front Biosci*, 7, **2002**, 1369-1395
- Berting, A.; Farcet, M. R. and Kreil, T. R. Virus susceptibility of Chinese hamster ovary (CHO) cells and detection of viral contaminations by adventitious agent testing. *Biotechnol Bioeng*, 106, 4, **2010**, 598-607
- Besold, K.; Frankenberg, N.; Pepperl-Klindworth, S.; Kuball, J.; Theobald, M.; Hahn, G. and Plachter, B. Processing and MHC class I presentation of human cytomegalovirus pp65-derived peptides persist despite gpUS2-11-mediated immune evasion. *J Gen Virol*, 88, 5, **2007**, 1429-1439
- Bhide, A. and Papageorghiou, A. T. Managing primary CMV infection in pregnancy. *BJOG*, 115, 7, **2008**, 805-807
- Bodaghi, B.; Slobbe-van Drunen, M. E.; Topilko, A.; Perret, E.; Vossen, R. C.; van Dam-Mieras, M. C.; Zipeto, D.; Virelizier, J. L.; LeHoang, P.; Bruggeman, C. A. and Michelson, S. Entry of human cytomegalovirus into retinal pigment epithelial and endothelial cells by endocytosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 40, 11, **1999**, 2598-2607
- Bogdanow, B.; Weisbach, H.; von Einem, J.; Straschewski, S.; Voigt, S.; Winkler, M.; Hagemeyer, C. and Wiebusch, L. Human cytomegalovirus tegument protein pp150 acts as a cyclin A2-CDK-dependent sensor of the host cell cycle and differentiation state. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 43, **2013**, 17510-17515
- Bonalumi, S.; Trapanese, A.; Santamaria, A.; D'Emidio, L. and Mobili, L. Cytomegalovirus infection in pregnancy: review of the literature. *J Prenat Med*, 5, 1, **2011**, 1-8
- Boppana, S. B. and Britt, W. Synopsis of Clinical Aspects of Human Cytomegalovirus Disease. In *Cytomegaloviruses from molecular pathogenesis to intervention*. Reddehase, M. J., Caister Academic Press: Norfolk, Volume 2, **2013**, 1-25
- Boppana, S. B.; Rivera, L. B.; Fowler, K. B.; Mach, M. and Britt, W. J. Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. *New Engl J Med*, 344, 18, **2001**, 1366-1371
- Borst, E. M.; Hahn, G.; Koszinowski, U. H. and Messerle, M. 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, 10, **1999**, 8320-8329
- Boshart, M.; Weber, F.; Jahn, G.; Dorsch-Hasler, K.; Fleckenstein, B. and Schaffner, W. A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell*, 41, 2, **1985**, 521-530
- Bratcher, D. F.; Bourne, N.; Brave, F. J.; Schleiss, M. R.; Slaoui, M.; Myers, M. G. and Bernstein, D. I. Effect of Passive Antibody on Congenital Cytomegalovirus-Infection in Guinea-Pigs. *J Infect Dis*, 172, 4, **1995**, 944-950
- Britt, W. Maturation and egress. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Arvin, A., Campadelli-Fiume, G., Mocarski, E. S., Moore, P. S., Roizman, B., Whitley, R. and Yamanishi, K., Cambridge University Press: Cambridge, **2007**, 311-323
- Britt, W. Manifestations of Human Cytomegalovirus Infection: Proposed Mechanisms of Acute and Chronic Disease. In *Human Cytomegalovirus: Current Topics in*

- Microbiology and Immunology*. Shenk, T. E. and Stinski, M. F., Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2008**, 417-470
- Britt, W. Controversies in the natural history of congenital human cytomegalovirus infection: the paradox of infection and disease in offspring of women with immunity prior to pregnancy. *Med Microbiol Immunol*, 204, 3, **2015**, 263-271
- Brühl, P.; Kerschbaum, A.; Kistner, O.; Barrett, N.; Dorner, F. and Gerencer, M. Humoral and cell-mediated immunity to vero cell-derived influenza vaccine. *Vaccine*, 19, 9-10, **2000**, 1149-1158
- Bühler, B.; Keil, G. M.; Weiland, F. and Koszinowski, U. H. Characterization of the murine cytomegalovirus early transcription unit e1 that is induced by immediate-early proteins. *J Virol*, 64, 5, **1990**, 1907-1919
- Büscher, N.; Paulus, C.; Nevels, M.; Tenzer, S. and Plachter, B. The proteome of human cytomegalovirus virions and dense bodies is conserved across different strains. *Med Microbiol Immunol*, 204, 3, **2015**, 285-293
- Caffarelli, N.; Fehr, A. R. and Yu, D. Cyclin A degradation by primate cytomegalovirus protein pUL21a counters its innate restriction of virus replication. *PLoS Pathog*, 9, 12, **2013**, e1003825
- Cannon, M. J. and Davis, K. F. Washing our hands of the congenital cytomegalovirus disease epidemic. *BMC Public Health*, 5, **2005**, 70
- Cannon, M. J.; Grosse, S. D. and Fowler, K. B. The Epidemiology and Public Health Impact of Congenital Cytomegalovirus Infection. In *Cytomegaloviruses from molecular pathogenesis to intervention*. Reddehase, M. J., Caister Academic Press: Norfolk, **2013**, 26-48
- Caposio, P.; Streblow, D. N. and Nelson, J. A. Cytomegalovirus Proteomics. In *Cytomegaloviruses from molecular pathogenesis to intervention*. Reddehase, M. J., Caister Academic Press: Norfolk, **2013**, 86-108
- Cayatte, C.; Schneider-Ohrum, K.; Wang, Z.; Irrinki, A.; Nguyen, N.; Lu, J.; Nelson, C.; Servat, E.; Gemmell, L.; Citkowicz, A.; Liu, Y.; Hayes, G.; Woo, J.; Van Nest, G.; Jin, H.; Duke, G. and McCormick, A. L. Cytomegalovirus vaccine strain townederived dense bodies induce broad cellular immune responses and neutralizing antibodies that prevent infection of fibroblasts and epithelial cells. *J Virol*, 87, 20, **2013**, 11107-11120
- Chan, C. Y. and Tambyah, P. A. Preflucel(R): a Vero-cell culture-derived trivalent influenza vaccine. *Expert Rev Vaccines*, 11, 7, **2012**, 759-773
- Chan, G.; Nogalski, M. T. and Yurochko, A. D. Activation of EGFR on monocytes is required for human cytomegalovirus entry and mediates cellular motility. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 52, **2009**, 22369-22374
- Chee, M. S.; Bankier, A. T.; Beck, S.; Bohni, R.; Brown, C. M.; Cerny, R.; Horsnell, T.; Hutchison, C. A., 3rd; Kouzarides, T.; Martignetti, J. A. and et al. Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol*, 154, **1990**, 125-169
- Chemaly, R. F.; Ullmann, A. J.; Stoelben, S.; Richard, M. P.; Bornhauser, M.; Groth, C.; Einsele, H.; Silverman, M.; Mullane, K. M.; Brown, J.; Nowak, H.; Kolling, K.; Stobernack, H. P.; Lischka, P.; Zimmermann, H.; Rubsamen-Schaeff, H.; Champlin, R. E.; Ehninger, G. and Team, A. I. C. S. Letermovir for cytomegalovirus prophylaxis in hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med*, 370, 19, **2014**, 1781-1789
- Chen, D. H.; Jiang, H.; Lee, M.; Liu, F. and Zhou, Z. H. Three-dimensional visualization of tegument/capsid interactions in the intact human cytomegalovirus. *Virology*, 260, 1, **1999**, 10-16
- Chevillotte, M.; Landwehr, S.; Linta, L.; Frascaroli, G.; Luske, A.; Buser, C.; Mertens, T. and von Einem, J. Major tegument protein pp65 of human cytomegalovirus is required for the incorporation of pUL69 and pUL97 into the virus particle and for viral growth in macrophages. *J Virol*, 83, 6, **2009**, 2480-2490
- Chu, C.; Lugovtsev, V.; Golding, H.; Betenbaugh, M. and Shiloach, J. Conversion of MDCK cell line to suspension culture by transfecting with human siat7e gene and

- its application for influenza virus production. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 35, **2009**, 14802-14807
- Cinatl, J., Jr.; Vogel, J. U.; Kotchetkov, R. and Wilhelm Doerr, H. Oncomodulatory signals by regulatory proteins encoded by human cytomegalovirus: a novel role for viral infection in tumor progression. *FEMS Microbiol Rev*, 28, 1, **2004**, 59-77
- Cobbold, M.; Khan, N.; Pourgheysari, B.; Tauro, S.; McDonald, D.; Osman, H.; Assenmacher, M.; Billingham, L.; Steward, C.; Crawley, C.; Olavarria, E.; Goldman, J.; Chakraverty, R.; Mahendra, P.; Craddock, C. and Moss, P. A. Adoptive transfer of cytomegalovirus-specific CTL to stem cell transplant patients after selection by HLA-peptide tetramers. *J Exp Med*, 202, 3, **2005**, 379-386
- Colberg-Poley, A. M. and Williamson, C. A. Intracellular Sorting and Trafficking of Cytomegalovirus Proteins during Permissive Infection. In *Cytomegaloviruses from molecular pathogenesis to intervention*. Reddehase, M. J., Caister Academic Press: Norfolk, **2013**, 196-229
- Compton, T.; Nepomuceno, R. R. and Nowlin, D. M. Human cytomegalovirus penetrates host cells by pH-independent fusion at the cell surface. *Virology*, 191, 1, **1992**, 387-395
- Compton, T.; Nowlin, D. M. and Cooper, N. R. Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology*, 193, 2, **1993**, 834-841
- Correa, C. B.; Kouri, V.; Verdasquera, D.; Martinez, P. A.; Alvarez, A.; Aleman, Y.; Perez, L.; Viera, J.; Gonzalez, R.; Perez, E.; Moro, I.; Navarro, M. A. and Melin, P. HCMV seroprevalence and associated risk factors in pregnant women, Havana City, 2007 to 2008. *Prenat Diagn*, 30, 9, **2010**, 888-892
- Craighead, J. E.; Kanich, R. E. and Almeida, J. D. Nonviral microbodies with viral antigenicity produced in cytomegalovirus-infected cells. *J Virol*, 10, 4, **1972**, 766-775
- Crough, T. and Khanna, R. Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin Microbiol Rev*, 22, 1, **2009**, 76-98
- Das, S.; Vasanji, A. and Pellett, P. E. Three-dimensional structure of the human cytomegalovirus cytoplasmic virion assembly complex includes a reoriented secretory apparatus. *J Virol*, 81, 21, **2007**, 11861-11869
- Davison, A. J. Herpesvirus systematics. *Vet Microbiol*, 143, 1, **2010**, 52-69
- Davison, A. J.; Dolan, A.; Akter, P.; Addison, C.; Dargan, D. J.; Alcendor, D. J.; McGeoch, D. J. and Hayward, G. S. The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *J Gen Virol*, 84, 1, **2003**, 17-28
- Davison, A. J.; Eberle, R.; Ehlers, B.; Hayward, G. S.; McGeoch, D. J.; Minson, A. C.; Pellett, P. E.; Roizman, B.; Studdert, M. J. and Thiry, E. The order Herpesvirales. *Arch Virol*, 154, 1, **2009**, 171-177
- De Coppi, P.; Bartsch, G., Jr.; Siddiqui, M. M.; Xu, T.; Santos, C. C.; Perin, L.; Mostoslavsky, G.; Serre, A. C.; Snyder, E. Y.; Yoo, J. J.; Furth, M. E.; Soker, S. and Atala, A. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol*, 25, 1, **2007**, 100-106
- de Wet, J. R.; Wood, K. V.; DeLuca, M.; Helinski, D. R. and Subramani, S. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol*, 7, 2, **1987**, 725-737
- Desmyter, J.; Melnick, J. L. and Rawls, W. E. Defectiveness of interferon production and of rubella virus interference in a line of African green monkey kidney cells (Vero). *J Virol*, 2, 10, **1968**, 955-961
- Digel, M.; Sampaio, K. L.; Jahn, G. and Sinzger, C. Evidence for direct transfer of cytoplasmic material from infected to uninfected cells during cell-associated spread of human cytomegalovirus. *J Clin Virol*, 37, 1, **2006**, 10-20
- Dobbins, J. G.; Stewart, J. A. and Demmler, G. J. Surveillance of congenital cytomegalovirus disease, 1990-1991. Collaborating Registry Group. *MMWR CDC Surveill Summ*, 41, 2, **1992**, 35-39

- Dolan, A.; Cunningham, C.; Hector, R. D.; Hassan-Walker, A. F.; Lee, L.; Addison, C.; Dargan, D. J.; McGeoch, D. J.; Gatherer, D.; Emery, V. C.; Griffiths, P. D.; Sinzger, C.; McSharry, B. P.; Wilkinson, G. W. and Davison, A. J. Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *J Gen Virol*, 85, 5, **2004**, 1301-1312
- Dollard, S. C.; Grosse, S. D. and Ross, D. S. New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection. *Rev Med Virol*, 17, 5, **2007**, 355-363
- Doroshenko, A. and Halperin, S. A. Trivalent MDCK cell culture-derived influenza vaccine Optaflu (Novartis Vaccines). *Expert Rev Vaccines*, 8, 6, **2009**, 679-688
- Dowling, J. N.; Saslow, A. R.; Armstrong, J. A. and Ho, M. The relationship of immunosuppression to cytomegalovirus infection. *Yale J Biol Med*, 49, 1, **1976**, 77-82
- Dunn, W.; Chou, C.; Li, H.; Hai, R.; Patterson, D.; Stolc, V.; Zhu, H. and Liu, F. Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 24, **2003**, 14223-14228
- Durocher, Y. and Butler, M. Expression systems for therapeutic glycoprotein production. *Curr Opin Biotechnol*, 20, 6, **2009**, 700-707
- Eickmann, M.; Gicklhorn, D. and Radsak, K. Glycoprotein Trafficking in Virion Morphogenesis. In *Cytomegaloviruses: Molecular Biology and Immunology*. Reddehase, M. J., Caister Academic Press: Norfolk, **2006**, 245-264
- Eifler, M.; Uecker, R.; Weisbach, H.; Bogdanow, B.; Richter, E.; Konig, L.; Vetter, B.; Lenac-Rovis, T.; Jonjic, S.; Neitzel, H.; Hagemeier, C. and Wiebusch, L. PUL21a-Cyclin A2 interaction is required to protect human cytomegalovirus-infected cells from the deleterious consequences of mitotic entry. *PLoS Pathog*, 10, 10, **2014**, e1004514
- Einsele, H.; Roosnek, E.; Rufer, N.; Sinzger, C.; Riegler, S.; Loffler, J.; Grigoleit, U.; Moris, A.; Rammensee, H. G.; Kanz, L.; Kleihauer, A.; Frank, F.; Jahn, G. and Hebart, H. Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood*, 99, 11, **2002**, 3916-3922
- Elek, S. D. and Stern, H. Development of a vaccine against mental retardation caused by cytomegalovirus infection in utero. *Lancet*, 1, 7845, **1974**, 1-5
- Ellsmore, V.; Reid, G. G. and Stow, N. D. Detection of human cytomegalovirus DNA replication in non-permissive Vero and 293 cells. *J Gen Virol*, 84, 3, **2003**, 639-645
- Emery, V. C. and Griffiths, P. D. Molecular biology of cytomegalovirus. *Int J Exp Pathol*, 71, 6, **1990**, 905-918
- Emery, V. C.; Milne, R. S. B. and Griffiths, P. D. Clinical Cytomegalovirus Research: Liver and Kidney Transplantation In *Cytomegaloviruses from molecular pathogenesis to intervention*. Reddehase, M. J., Caister Academic Press: Norfolk, 2, **2013**, 301-311
- Escoffier, C. and Gerlier, D. Infection of chicken embryonic fibroblasts by measles virus: adaptation at the virus entry level. *J Virol*, 73, 6, **1999**, 5220-5224
- Everett, R. D. and Chelbi-Alix, M. K. PML and PML nuclear bodies: implications in antiviral defence. *Biochimie*, 89, 6-7, **2007**, 819-830
- Fallaux, F. J.; Bout, A.; van der Velde, I.; van den Wollenberg, D. J.; Hehir, K. M.; Keegan, J.; Auger, C.; Cramer, S. J.; van Ormondt, H.; van der Eb, A. J.; Valerio, D. and Hoeben, R. C. New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum Gene Ther*, 9, 13, **1998**, 1909-1917
- Fallaux, F. J.; Kranenburg, O.; Cramer, S. J.; Houweling, A.; Van Ormondt, H.; Hoeben, R. C. and Van Der Eb, A. J. Characterization of 911: a new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors. *Hum Gene Ther*, 7, 2, **1996**, 215-222
- Farson, D.; Tao, L.; Ko, D.; Li, Q.; Brignetti, D.; Segawa, K.; Mittelstaedt, D.; Harding, T.; Yu, D. C. and Li, Y. Development of novel E1-complementary cells for adenoviral

- production free of replication-competent adenovirus. *Mol Ther*, 14, 2, **2006**, 305-311
- Fedson, D. S. NEW technologies for meeting the global demand for pandemic influenza vaccines. *Biologicals*, 36, 6, **2008**, 346-349
- Feire, A. L.; Koss, H. and Compton, T. Cellular integrins function as entry receptors for human cytomegalovirus via a highly conserved disintegrin-like domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 43, **2004**, 15470-15475
- Figuroa, M. E.; Geder, L. and Rapp, F. Infection of human amnion cells with cytomegalovirus. *J Med Virol*, 2, 4, **1978**, 369-375
- Fischer, S.; Charara, N.; Gerber, A.; Wolfel, J.; Schiedner, G.; Voedisch, B. and Geisse, S. Transient recombinant protein expression in a human amniocyte cell line: the CAP-T(R) cell system. *Biotechnol Bioeng*, 109, 9, **2012**, 2250-2261
- Fleckenstein, B.; Muller, I. and Collins, J. Cloning of the complete human cytomegalovirus genome in cosmids. *Gene*, 18, 1, **1982**, 39-46
- Fortunato, E. A.; Sanchez, V.; Yen, J. Y. and Spector, D. H. Infection of cells with human cytomegalovirus during S phase results in a blockade to immediate-early gene expression that can be overcome by inhibition of the proteasome. *J Virol*, 76, 11, **2002**, 5369-5379
- Fraile-Ramos, A.; Kledal, T. N.; Pelchen-Matthews, A.; Bowers, K.; Schwartz, T. W. and Marsh, M. The human cytomegalovirus US28 protein is located in endocytic vesicles and undergoes constitutive endocytosis and recycling. *Mol Biol Cell*, 12, 6, **2001**, 1737-1749
- Freed, D. C.; Tang, Q.; Tang, A.; Li, F.; He, X.; Huang, Z.; Meng, W.; Xia, L.; Finnefrock, A. C.; Durr, E.; Espeseth, A. S.; Casimiro, D. R.; Zhang, N.; Shiver, J. W.; Wang, D.; An, Z. and Fu, T. M. Pentameric complex of viral glycoprotein H is the primary target for potent neutralization by a human cytomegalovirus vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 51, **2013**, 4997-5005
- Frey, S. E.; Harrison, C.; Pass, R. F.; Yang, E.; Boken, D.; Sekulovich, R. E.; Percell, S.; Izu, A. E.; Hirabayashi, S.; Burke, R. L. and Duliege, A. M. Effects of antigen dose and immunization regimens on antibody responses to a cytomegalovirus glycoprotein B subunit vaccine. *J. Infect. Dis.*, 180, 5, **1999**, 1700-1703
- Furui, Y.; Satake, M.; Hoshi, Y.; Uchida, S.; Suzuki, K. and Tadokoro, K. Cytomegalovirus (CMV) seroprevalence in Japanese blood donors and high detection frequency of CMV DNA in elderly donors. *Transfusion*, 53, 10, **2013**, 2190-2197
- Gallimore, P. H.; Grand, R. J. and Byrd, P. J. Transformation of human embryo retinoblasts with simian virus 40, adenovirus and ras oncogenes. *Anticancer Res*, 6, 3, B, **1986**, 499-508
- Gamadia, L. E.; Rentenaar, R. J.; Baars, P. A.; Remmerswaal, E. B.; Surachno, S.; Weel, J. F.; Toebes, M.; Schumacher, T. N.; ten Berge, I. J. and van Lier, R. A. Differentiation of cytomegalovirus-specific CD8(+) T cells in healthy and immunosuppressed virus carriers. *Blood*, 98, 3, **2001**, 754-761
- Gaush, C. R.; Hard, W. L. and Smith, T. F. Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK). *Proc Soc Exp Biol Med*, 122, 3, **1966**, 931-935
- Gawn, J. M. and Greaves, R. F. Absence of IE1 p72 protein function during low-multiplicity infection by human cytomegalovirus results in a broad block to viral delayed-early gene expression. *J Virol*, 76, 9, **2002**, 4441-4455
- Genzel, Y. Designing cell lines for viral vaccine production: Where do we stand? *Biotechnol J*, 10, 5, **2015**, 728-740
- Genzel, Y.; Behrendt, I.; Rodig, J.; Rapp, E.; Kueppers, C.; Kochanek, S.; Schiedner, G. and Reichl, U. CAP, a new human suspension cell line for influenza virus production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97, 1, **2013**, 111-122
- Genzel, Y. and Reichl, U. Continuous cell lines as a production system for influenza vaccines. *Expert Rev Vaccines*, 8, 12, **2009**, 1681-1692
- Genzel, Y.; Vogel, T.; Buck, J.; Behrendt, I.; Ramirez, D. V.; Schiedner, G.; Jordan, I. and Reichl, U. High cell density cultivations by alternating tangential flow (ATF)

- perfusion for influenza A virus production using suspension cells. *Vaccine*, 32, 24, **2014**, 2770-2781
- Gerdil, C. The annual production cycle for influenza vaccine. *Vaccine*, 21, 16, **2003**, 1776-1779
- Gerna, G.; Percivalle, E.; Lilleri, D.; Lozza, L.; Fornara, C.; Hahn, G.; Baldanti, F. and Revello, M. G. Dendritic-cell infection by human cytomegalovirus is restricted to strains carrying functional UL131-128 genes and mediates efficient viral antigen presentation to CD8+ T cells. *J Gen Virol*, 86, 2, **2005**, 275-284
- Gibson, W. Structure and Formation of the Cytomegalovirus Virion. In *Human Cytomegalovirus*. Shenk, T. E. and Stinski, M. F., Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2008**, 187-199
- Gibson, W. and Bogner, E. Morphogenesis of the Cytomegalovirus Virion and Subviral Particles. In *Cytomegaloviruses from molecular pathogenesis to intervention*. Reddehase, M. J., Caister Academic Press: Norfolk, **2013**, 230-246
- Goodpasture, E. W.; Woodruff, A. M. and Buddingh, G. J. The Cultivation of Vaccine and Other Viruses in the Chorioallantoic Membrane of Chick Embryos. *Science*, 74, 1919, **1931**, 371-372
- Graham, F. L.; Smiley, J.; Russell, W. C. and Nairn, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, 36, 1, **1977**, 59-74
- Graham, L. and Orenstein, J. M. Processing tissue and cells for transmission electron microscopy in diagnostic pathology and research. *Nat Protoc*, 2, 10, **2007**, 2439-2450
- Greaves, R. F. and Mocarski, E. S. 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, 1, **1998**, 366-379
- Gregersen, J. P.; Schmitt, H. J.; Trusheim, H. and Broker, M. Safety of MDCK cell culture-based influenza vaccines. *Future Microbiol*, 6, 2, **2011**, 143-152
- Griffiths, P. D. CMV vaccine trial endpoints. *J Clin Virol*, 46 Suppl 4, **2009**, 64-67
- Hacker, D. L.; De Jesus, M. and Wurm, F. M. 25 years of recombinant proteins from reactor-grown cells - where do we go from here? *Biotechnol Adv*, 27, 6, **2009**, 1023-1027
- Hahn, G.; Khan, H.; Baldanti, F.; Koszinowski, U. H.; Revello, M. G. and Gerna, G. The human cytomegalovirus ribonucleotide reductase homolog UL45 is dispensable for growth in endothelial cells, as determined by a BAC-cloned clinical isolate of human cytomegalovirus with preserved wild-type characteristics. *J Virol*, 76, 18, **2002**, 9551-9555
- Hahn, G.; Revello, M. G.; Patrone, M.; Percivalle, E.; Campanini, G.; Sarasini, A.; Wagner, M.; Gallina, A.; Milanese, G.; Koszinowski, U.; Baldanti, F. and Gerna, G. Human cytomegalovirus UL131-128 genes are indispensable for virus growth in endothelial cells and virus transfer to leukocytes. *J Virol*, 78, 18, **2004**, 10023-10033
- Halperin, S. A. Prevention of pertussis across the age spectrum through the use of the combination vaccines PENTACEL and ADACEL. *Expert Opin Biol Ther*, 6, 8, **2006**, 807-821
- Halperin, S. A.; Smith, B.; Mabrouk, T.; Germain, M.; Trepanier, P.; Hassell, T.; Treanor, J.; Gauthier, R. and Mills, E. L. Safety and immunogenicity of a trivalent, inactivated, mammalian cell culture-derived influenza vaccine in healthy adults, seniors, and children. *Vaccine*, 20, 7-8, **2002**, 1240-1247
- Hansen, S. G.; Sacha, J. B.; Hughes, C. M.; Ford, J. C.; Burwitz, B. J.; Scholz, I.; Gilbride, R. M.; Lewis, M. S.; Gilliam, A. N.; Ventura, A. B.; Malouli, D.; Xu, G.; Richards, R.; Whizin, N.; Reed, J. S.; Hammond, K. B.; Fischer, M.; Turner, J. M.; Legasse, A. W.; Axthelm, M. K.; Edlefsen, P. T.; Nelson, J. A.; Lifson, J. D.; Fruh, K. and Picker, L. J. Cytomegalovirus vectors violate CD8+ T cell epitope recognition paradigms. *Science*, 340, 6135, **2013**, 1237874

- Harari, A.; Zimmerli, S. C. and Pantaleo, G. Cytomegalovirus (CMV)-specific cellular immune responses. *Hum Immunol*, 65, 5, **2004**, 500-506
- Hardy, C. T.; Young, S. A.; Webster, R. G.; Naeve, C. W. and Owens, R. J. Egg fluids and cells of the chorioallantoic membrane of embryonated chicken eggs can select different variants of influenza A (H3N2) viruses. *Virology*, 211, 1, **1995**, 302-306
- Hauser, H. and Wagner, R. *Animal Cell Biotechnology: In Biologics Production*. De Gruyter: Berlin, **2014**
- Hayflick, L. The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res*, 37, **1965**, 614-636
- Heineman, T. C.; Schleiss, M.; Bernstein, D. I.; Spaete, R. R.; Yan, L.; Duke, G.; Prichard, M.; Wang, Z.; Yan, Q.; Sharp, M. A.; Klein, N.; Arvin, A. M. and Kemble, G. A phase 1 study of 4 live, recombinant human cytomegalovirus Towne/Toledo chimeric vaccines. *J. Infect. Dis.*, 193, 10, **2006**, 1350-1360
- Ho, M. The history of cytomegalovirus and its diseases. *Med Microbiol Immunol*, 197, 2, **2008**, 65-73
- Hofmann, I.; Wen, Y.; Ciferri, C.; Schulze, A.; Fuhner, V.; Leong, M.; Gerber, A.; Gerrein, R.; Nandi, A.; Lilja, A. E.; Carfi, A. and Laux, H. Expression of the human cytomegalovirus pentamer complex for vaccine use in a CHO system. *Biotechnol Bioeng*, 112, 12, **2015**, 2505-2515
- Honess, R. W. and Roizman, B. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *J Virol*, 14, 1, **1974**, 8-19
- Horvath, R.; Cerny, J.; Benedik, J., Jr.; Hokl, J.; Jelinkova, I. and Benedik, J. The possible role of human cytomegalovirus (HCMV) in the origin of atherosclerosis. *J Clin Virol*, 16, 1, **2000**, 17-24
- Huang, E. S. Human cytomegalovirus. IV. Specific inhibition of virus-induced DNA polymerase activity and viral DNA replication by phosphonoacetic acid. *J Virol*, 16, 6, **1975**, 1560-1565
- Ibanez, C. E.; Schrier, R.; Ghazal, P.; Wiley, C. and Nelson, J. A. Human cytomegalovirus productively infects primary differentiated macrophages. *J Virol*, 65, 12, **1991**, 6581-6588
- Irmiere, A. and Gibson, W. Isolation and characterization of a noninfectious virion-like particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus. *Virology*, 130, 1, **1983**, 118-133
- Isaacson, M. K. and Compton, T. Human cytomegalovirus glycoprotein B is required for virus entry and cell-to-cell spread but not for virion attachment, assembly, or egress. *J Virol*, 83, 8, **2009**, 3891-3903
- Isomura, H. and Stinski, M. F. The human cytomegalovirus major immediate-early enhancer determines the efficiency of immediate-early gene transcription and viral replication in permissive cells at low multiplicity of infection. *J Virol*, 77, 6, **2003**, 3602-3614
- Jacobs, J. P.; Jones, C. M. and Baille, J. P. Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature*, 227, 5254, **1970**, 168-170
- Jarrett, O. and Macpherson, I. The basis of the tumorigenicity of BHK 21 cells. *Int J Cancer*, 3, 5, **1968**, 654-662
- Jayapal, K. R.; Wlaschin, K. F.; Hu, W. S. and Yap, M. G. S. Recombinant protein therapeutics from CHO cells - 20 years and counting. *Chem Eng Prog*, 103, 10, **2007**, 40-47
- Jiang, X. J.; Adler, B.; Sampaio, K. L.; Digel, M.; Jahn, G.; Ettischer, N.; Stierhof, Y. D.; Scrivano, L.; Koszinowski, U.; Mach, M. and Sinzger, C. UL74 of human cytomegalovirus contributes to virus release by promoting secondary envelopment of virions. *J Virol*, 82, 6, **2008**, 2802-2812
- Johnson, D. C. and Baines, J. D. Herpesviruses remodel host membranes for virus egress. *Nat Rev Microbiol*, 9, 5, **2011**, 382-394

- Jones, T. R. and Muzithras, V. P. A cluster of dispensable genes within the human cytomegalovirus genome short component: IRS1, US1 through US5, and the US6 family. *J Virol*, 66, 4, **1992**, 2541-2546
- Kabanova, A.; Perez, L.; Lilleri, D.; Marcandalli, J.; Agatic, G.; Becattini, S.; Preite, S.; Fuschillo, D.; Percivalle, E.; Sallusto, F.; Gerna, G.; Corti, D. and Lanzavecchia, A. Antibody-driven design of a human cytomegalovirus gHgLpUL128L subunit vaccine that selectively elicits potent neutralizing antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 50, **2014**, 17965-17970
- Kalejta, R. F. Functions of human cytomegalovirus tegument proteins prior to immediate early gene expression. *Curr Top Microbiol Immunol*, 325, **2008a**, 101-115
- Kalejta, R. F. Tegument proteins of human cytomegalovirus. *Microbiol Mol Biol Rev*, 72, 2, **2008b**, 249-265,
- Kari, B. and Gehrz, R. A human cytomegalovirus glycoprotein complex designated gC-II is a major heparin-binding component of the envelope. *J Virol*, 66, 3, **1992**, 1761-1764
- Kari, B. and Gehrz, R. Structure, composition and heparin binding properties of a human cytomegalovirus glycoprotein complex designated gC-II. *J Gen Virol*, 74, 2, **1993**, 255-264
- Katz, S. L.; Milovanovic, M. V. and Enders, J. F. Propagation of measles virus in cultures of chick embryo cells. *Proc Soc Exp Biol Med*, 97, 1, **1958**, 23-29
- Kaul, D. R.; Stoelben, S.; Cober, E.; Ojo, T.; Sandusky, E.; Lischka, P.; Zimmermann, H. and Rubsamen-Schaeff, H. First report of successful treatment of multidrug-resistant cytomegalovirus disease with the novel anti-CMV compound AIC246. *Am J Transplant*, 11, 5, **2011**, 1079-1084
- Keil, G. M.; Ebeling-Keil, A. and Koszinowski, U. H. Temporal regulation of murine cytomegalovirus transcription and mapping of viral RNA synthesized at immediate early times after infection. *J Virol*, 50, 3, **1984**, 784-795
- Kenneson, A. and Cannon, M. J. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev Med Virol*, 17, 4, **2007**, 253-276
- Kern, F.; Bunde, T.; Faulhaber, N.; Kiecker, F.; Khatamzas, E.; Rudawski, I. M.; Pruss, A.; Gratama, J. W.; Volkmer-Engert, R.; Ewert, R.; Reinke, P.; Volk, H. D. and Picker, L. J. Cytomegalovirus (CMV) phosphoprotein 65 makes a large contribution to shaping the T cell repertoire in CMV-exposed individuals. *J Infect Dis*, 185, 12, **2002**, 1709-1716
- Kharfan-Dabaja, M. A.; Boeckh, M.; Wilck, M. B.; Langston, A. A.; Chu, A. H.; Wloch, M. K.; Guterwill, D. F.; Smith, L. R.; Rolland, A. P. and Kenney, R. T. A novel therapeutic cytomegalovirus DNA vaccine in allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Infect Dis*, 12, 4, **2012**, 290-299
- Kim, E. Y.; Lee, K. B. and Kim, M. K. The potential of mesenchymal stem cells derived from amniotic membrane and amniotic fluid for neuronal regenerative therapy. *BMB Rep*, 47, 3, **2014**, 135-140
- Kim, M.; Lim, M. Y. and Ko, G. Enhancement of enteric adenovirus cultivation by viral transactivator proteins. *Appl Environ Microbiol*, 76, 8, **2010**, 2509-2516
- Kirchmeier, M.; Fluckiger, A. C.; Soare, C.; Bozic, J.; Ontsouka, B.; Ahmed, T.; Diress, A.; Pereira, L.; Schodel, F.; Plotkin, S.; Dalba, C.; Klatzmann, D. and Anderson, D. E. Enveloped virus-like particle expression of human cytomegalovirus glycoprotein B antigen induces antibodies with potent and broad neutralizing activity. *Clin Vaccine Immunol*, 21, 2, **2014**, 174-180
- Kistner, O.; Barrett, P. N.; Mundt, W.; Reiter, M.; Schober-Bendixen, S. and Dorner, F. Development of a mammalian cell (Vero) derived candidate influenza virus vaccine. *Vaccine*, 16, 9-10, **1998**, 960-968
- Knoll, M. R., E. Das Elektronenmikroskop. *Z Physik*, 78, **1932**, 318-339
- Koike, C.; Zhou, K.; Takeda, Y.; Fathy, M.; Okabe, M.; Yoshida, T.; Nakamura, Y.; Kato, Y. and Nikaido, T. Characterization of amniotic stem cells. *Cell Reprogram*, 16, 4, **2014**, 298-305

- Korioth, F.; Maul, G. G.; Plachter, B.; Stamminger, T. and Frey, J. The nuclear domain 10 (ND10) is disrupted by the human cytomegalovirus gene product IE1. *Exp Cell Res*, 229, 1, **1996**, 155-158
- Kricka, L. J. and Stanley, P. E. Bioluminescence and chemiluminescence literature. The 1990 literature: Part I. *J Biolumin Chemilumin*, 6, 3, **1991**, 203-220
- Kuczewski, M.; Schirmer, E.; Lain, B. and Zarbis-Papastoitsis, G. A single-use purification process for the production of a monoclonal antibody produced in a PER.C6 human cell line. *Biotechnol J*, 6, 1, **2011**, 56-65
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 5259, **1970**, 680-685
- Lagler, H.; Wenisch, J. M.; Tobudic, S.; Gualdoni, G. A.; Rodler, S.; Rasoul-Rockenschaub, S.; Jaksch, P.; Redlberger-Fritz, M.; Popow-Kraupp, T. and Burgmann, H. Pandemic influenza A H1N1 vaccine in recipients of solid organ transplants: immunogenicity and tolerability outcomes after vero cell derived, non-adjuvanted, whole-virion vaccination. *Vaccine*, 29, 40, **2011**, 6888-6893
- Ledwith, B. J.; Lanning, C. L.; Gumprecht, L. A.; Anderson, C. A.; Coleman, J. B.; Gatto, N. T.; Balasubramanian, G.; Farris, G. M.; Kemp, R. K.; Harper, L. B.; Barnum, A. B.; Pacchione, S. J.; Mauer, K. L.; Troilo, P. F.; Brown, E. R.; Wolf, J. J.; Lebronl, J. A.; Lewis, J. A. and Nichols, W. W. Tumorigenicity assessments of Per.C6 cells and of an Ad5-vectored HIV-1 vaccine produced on this continuous cell line. *Dev Biol*, 123, **2006**, 251-266
- Lee, H. R.; Kim, D. J.; Lee, J. M.; Choi, C. Y.; Ahn, B. Y.; Hayward, G. S. and Ahn, J. H. Ability of the human cytomegalovirus IE1 protein to modulate sumoylation of PML correlates with its functional activities in transcriptional regulation and infectivity in cultured fibroblast cells. *J Virol*, 78, 12, **2004**, 6527-6542
- Lemckert, A. A.; Grimbergen, J.; Smits, S.; Hartkoorn, E.; Holterman, L.; Berkhout, B.; Barouch, D. H.; Vogels, R.; Quax, P.; Goudsmit, J. and Havenga, M. J. Generation of a novel replication-incompetent adenoviral vector derived from human adenovirus type 49: manufacture on PER.C6 cells, tropism and immunogenicity. *J Gen Virol*, 87, 10, **2006**, 2891-2899
- Lilja, A. E. and Mason, P. W. The next generation recombinant human cytomegalovirus vaccine candidates-beyond gB. *Vaccine*, 30, 49, **2012**, 6980-6990
- Lilleri, D.; Fornara, C.; Revello, M. G. and Gerna, G. Human cytomegalovirus-specific memory CD8+ and CD4+ T cell differentiation after primary infection. *J Infect Dis*, 198, 4, **2008**, 536-543
- Limaye, A. P.; Bakthavatsalam, R.; Kim, H. W.; Randolph, S. E.; Halldorson, J. B.; Healey, P. J.; Kuhr, C. S.; Levy, A. E.; Perkins, J. D.; Reyes, J. D. and Boeckh, M. Impact of cytomegalovirus in organ transplant recipients in the era of antiviral prophylaxis. *Transplantation*, 81, 12, **2006**, 1645-1652
- Liu, Y.; Cui, Z.; Zhang, Z.; Wei, H.; Zhou, Y.; Wang, M. and Zhang, X. E. The tegument protein UL94 of human cytomegalovirus as a binding partner for tegument protein pp28 identified by intracellular imaging. *Virology*, 388, 1, **2009**, 68-77
- Livak, K. J.; Flood, S. J.; Marmaro, J.; Giusti, W. and Deetz, K. 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, 6, **1995**, 357-362
- Ljungman, P.; Griffiths, P. and Paya, C. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis*, 34, 8, **2002**, 1094-1097
- Ljungman, P.; Hakki, M. and Boeckh, M. Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Infect Dis Clin North Am*, 24, 2, **2010**, 319-337
- Lohr, V.; Genzel, Y.; Behrendt, I.; Scharfenberg, K. and Reichl, U. A new MDCK suspension line cultivated in a fully defined medium in stirred-tank and wave bioreactor. *Vaccine*, 28, 38, **2010**, 6256-6264
- Louis, N.; Eveleigh, C. and Graham, F. L. Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line. *Virology*, 233, 2, **1997**, 423-429

- Lübeck, P. R.; Doerr, H. W. and Rabenau, H. F. Epidemiology of human cytomegalovirus (HCMV) in an urban region of Germany: what has changed? *Med Microbiol Immunol*, 199, 1, **2010**, 53-60
- Macpherson, I. Characteristics of a Hamster Cell Clone Transformed by Polyoma Virus. *J Natl Cancer Inst*, 30, 4, **1963**, 795-815
- Macpherson, I. and Stoker, M. Polyoma transformation of hamster cell clones--an investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virology*, 16, **1962**, 147-151
- Madin, S. H. and Darby, N. B., Jr. Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin. *Proc Soc Exp Biol Med*, 98, 3, **1958**, 574-576
- Maidji, E.; Nigro, G.; Tabata, T.; McDonagh, S.; Nozawa, N.; Shiboski, S.; Muci, S.; Anceschi, M. M.; Aziz, N.; Adler, S. P. and Pereira, L. Antibody Treatment Promotes Compensation for Human Cytomegalovirus-Induced Pathogenesis and a Hypoxia-Like Condition in Placentas with Congenital Infection. *Am J Pathol*, 177, 3, **2010**, 1298-1310
- Manicklal, S.; Emery, V. C.; Lazzarotto, T.; Boppana, S. B. and Gupta, R. K. The "silent" global burden of congenital cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev*, 26, 1, **2013**, 86-102
- Manohar, M.; Orrison, B.; Peden, K. and Lewis, A. M., Jr. Assessing the tumorigenic phenotype of VERO cells in adult and newborn nude mice. *Biologicals*, 36, 1, **2008**, 65-72
- Marchini, A.; Liu, H. and Zhu, H. Human cytomegalovirus with IE-2 (UL122) deleted fails to express early lytic genes. *J Virol*, 75, 4, **2001**, 1870-1878
- Marsh, M. and Bron, R. SFV infection in CHO cells: cell-type specific restrictions to productive virus entry at the cell surface. *J Cell Sci*, 110, 1, **1997**, 95-103
- Matsunaga, S.; Uchide, N.; Shono, M.; Ohyama, K.; Takeichi, M. and Toyoda, H. Differences in permissive cytomegalovirus infection between primary cultured human fetal membrane chorion and amnion cells. *Biol Pharm Bull*, 36, 11, **2013**, 1715-1721
- Mattes, F. M.; McLaughlin, J. E.; Emery, V. C.; Clark, D. A. and Griffiths, P. D. Histopathological detection of owl's eye inclusions is still specific for cytomegalovirus in the era of human herpesviruses 6 and 7. *J Clin Pathol*, 53, 8, **2000**, 612-614
- Mayr, A. and Rolle, M. *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. MVS Medizinverlage: Stuttgart, **2006**
- McCormick, F. Cancer gene therapy: fringe or cutting edge? *Nat Rev Cancer*, 1, 2, **2001**, 130-141
- Meier, J. L. and Stinski, M. F. Major Immediate-Early Enhancer and Its Gene Products. In *Cytomegaloviruses from molecular pathogenesis to intervention*. Reddehase, M. J., Caister Academic Press: Norfolk, **2013**, 152-173
- Meissner, C. S.; Suffner, S.; Schauflinger, M.; von Einem, J. and Bogner, E. A leucine zipper motif of a tegument protein triggers final envelopment of human cytomegalovirus. *J Virol*, 86, 6, **2012**, 3370-3382
- Mersseman, V.; Besold, K.; Reddehase, M. J.; Wolfrum, U.; Strand, D.; Plachter, B. and Reyda, S. Exogenous introduction of an immunodominant peptide from the non-structural IE1 protein of human cytomegalovirus into the MHC class I presentation pathway by recombinant dense bodies. *J Gen Virol*, 89, 2, **2008a**, 369-379
- Mersseman, V.; Besold, K.; Reddehase, M. J.; Wolfrum, U.; Strand, D.; Plachter, B. and Reyda, S. Exogenous introduction of an immunodominant peptide from the non-structural IE1 protein of human cytomegalovirus into the MHC class I presentation pathway by recombinant dense bodies. *J Gen Virol*, 89, 2, **2008b**, 369-379
- Mettenleiter, T. C. Intriguing interplay between viral proteins during herpesvirus assembly or: the herpesvirus assembly puzzle. *Vet Microbiol*, 113, 3-4, **2006**, 163-169

- Mettenleiter, T. C.; Klupp, B. G. and Granzow, H. Herpesvirus assembly: an update. *Virus Res*, 143, 2, **2009**, 222-234
- Meyer, H.; Bankier, A. T.; Landini, M. P.; Brown, C. M.; Barrell, B. G.; Ruger, B. and Mach, M. Identification and procaryotic expression of the gene coding for the highly immunogenic 28-kilodalton structural phosphoprotein (pp28) of human cytomegalovirus. *J Virol*, 62, 7, **1988**, 2243-2250
- Michel, D.; Chevillotte, M. and Mertens, T. Antiviral Therapy, Drug Resistance and Computed Resistance Profiling. In *Cytomegaloviruses from molecular pathogenesis to intervention*. Reddehase, M. J., Caister Academic Press: Norfolk, 2, **2013**, 402-423
- Miller, M. S. and Hertel, L. Onset of human cytomegalovirus replication in fibroblasts requires the presence of an intact vimentin cytoskeleton. *J Virol*, 83, 14, **2009**, 7015-7028
- Mocarski, E. S.; Kemble, G. W.; Lyle, J. M. and Greaves, R. F. A deletion mutant in the human cytomegalovirus gene encoding IE1(491aa) is replication defective due to a failure in autoregulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 21, **1996**, 11321-11326
- Mocarski, E. S.; Shenk, T.; Griffiths, P. and Pass, R. F. Cytomegaloviruses. In *Fields Virology*. Fields, B. N., Knipe, D. M. and Howley, P. M., Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, **2013**, 1960-2014
- Montomoli, E.; Khadang, B.; Piccirella, S.; Trombetta, C.; Mennitto, E.; Manini, I.; Stanzani, V. and Lapini, G. Cell culture-derived influenza vaccines from Vero cells: a new horizon for vaccine production. *Expert Rev Vaccines*, 11, 5, **2012**, 587-594
- Murrell, I.; Tomasec, P.; Wilkie, G. S.; Dargan, D. J.; Davison, A. J. and Stanton, R. J. Impact of sequence variation in the UL128 locus on production of human cytomegalovirus in fibroblast and epithelial cells. *J Virol*, 87, 19, **2013**, 10489-10500
- Myerson, D.; Hackman, R. C.; Nelson, J. A.; Ward, D. C. and McDougall, J. K. Widespread presence of histologically occult cytomegalovirus. *Hum Pathol*, 15, 5, **1984**, 430-439
- Neiman, P. E.; Reeves, W.; Ray, G.; Flournoy, N.; Lerner, K. G.; Sale, G. E. and Thomas, E. D. A prospective analysis interstitial pneumonia and opportunistic viral infection among recipients of allogeneic bone marrow grafts. *J Infect Dis*, 136, 6, **1977**, 754-767
- Nigro, G.; Adler, S. P.; La Torre, R.; Best, A. M. and Collabo, C. C. Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. *New Engl J Med*, 353, 13, **2005**, 1350-1362
- Noris, E.; Zannetti, C.; Demurtas, A.; Sinclair, J.; De Andrea, M.; Gariglio, M. and Landolfo, S. Cell cycle arrest by human cytomegalovirus 86-kDa IE2 protein resembles premature senescence. *J Virol*, 76, 23, **2002**, 12135-12148
- Oduro, J. D.; Uecker, R.; Hagemeyer, C. and Wiebusch, L. Inhibition of human cytomegalovirus immediate-early gene expression by cyclin A2-dependent kinase activity. *J Virol*, 86, 17, **2012**, 9369-9383
- Ogawa-Goto, K.; Tanaka, K.; Gibson, W.; Moriishi, E.; Miura, Y.; Kurata, T.; Irie, S. and Sata, T. Microtubule network facilitates nuclear targeting of human cytomegalovirus capsid. *J Virol*, 77, 15, **2003**, 8541-8547
- Ojala, P. M.; Sodeik, B.; Ebersold, M. W.; Kutay, U. and Helenius, A. Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro. *Mol Cell Biol*, 20, 13, **2000**, 4922-4931
- Onions, D.; Egan, W.; Jarrett, R.; Novicki, D. and Gregersen, J. P. Validation of the safety of MDCK cells as a substrate for the production of a cell-derived influenza vaccine. *Biologicals*, 38, 5, **2010**, 544-551
- Ornoy, A. and Diav-Citrin, O. Fetal effects of primary and secondary cytomegalovirus infection in pregnancy. *Reprod Toxicol*, 21, 4, **2006**, 399-409

- Pari, G. S. and Anders, D. G. Eleven loci encoding trans-acting factors are required for transient complementation of human cytomegalovirus oriLyt-dependent DNA replication. *J Virol*, 67, 12, **1993**, 6979-6988
- Pass, R. F. Epidemiology and transmission of cytomegalovirus. *J Infect Dis*, 152, 2, **1985**, 243-248
- Pass, R. F. Development and evidence for efficacy of CMV glycoprotein B vaccine with MF59 adjuvant. *J Clin Virol*, 46 Suppl 4, **2009**, 73-76
- Pass, R. F.; Duliege, A. M.; Boppana, S.; Sekulovich, R.; Percell, S.; Britt, W. and Burke, R. L. A subunit cytomegalovirus vaccine based on recombinant envelope glycoprotein B and a new adjuvant. *J Infect Dis*, 180, 4, **1999**, 970-975
- Pass, R. F.; Fowler, K. B.; Boppana, S. B.; Britt, W. J. and Stagno, S. Congenital cytomegalovirus infection following first trimester maternal infection: symptoms at birth and outcome. *J Clin Virol*, 35, 2, **2006**, 216-220
- Paulus, C. and Nevels, M. The human cytomegalovirus major immediate-early proteins as antagonists of intrinsic and innate antiviral host responses. *Viruses*, 1, 3, **2009**, 760-779
- Peggs, K. S.; Verfuether, S.; Pizzey, A.; Khan, N.; Guiver, M.; Moss, P. A. and Mackinnon, S. Adoptive cellular therapy for early cytomegalovirus infection after allogeneic stem-cell transplantation with virus-specific T-cell lines. *Lancet*, 362, 9393, **2003**, 1375-1377
- Pellet, P. E. and Roizman, B. The family Herpesviridae: a brief introduction. In *Fields Virology*. H., K. D. M. P., Griffin D. E., L. R. A., Martin M. A., R. B. and E., S. S., Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, **2007**, 2479-2499
- Pepperl-Klindworth, S.; Frankenberg, N. and Plachter, B. Development of novel vaccine strategies against human cytomegalovirus infection based on subviral particles. *J Clin Virol*, 25 Suppl 2, **2002**, 75-85
- Pepperl, S.; Munster, J.; Mach, M.; Harris, J. R. and Plachter, B. Dense bodies of human cytomegalovirus induce both humoral and cellular immune responses in the absence of viral gene expression. *J Virol*, 74, 13, **2000**, 6132-6146
- Pereira, L.; Pettitt, M.; Fong, A.; Tsuge, M.; Tabata, T.; Fang-Hoover, J.; Maidji, E.; Zydek, M.; Zhou, Y.; Inoue, N.; Loghavi, S.; Pepkowitz, S.; Kauvar, L. M. and Ogunyemi, D. Intrauterine growth restriction caused by underlying congenital cytomegalovirus infection. *J Infect Dis*, 209, 10, **2014**, 1573-1584
- Petrik, D. T.; Schmitt, K. P. and Stinski, M. F. Inhibition of cellular DNA synthesis by the human cytomegalovirus IE86 protein is necessary for efficient virus replication. *J Virol*, 80, 8, **2006**, 3872-3883
- Plotkin, S. and Plachter, B. Cytomegalovirus Vaccine: On the Way to the Future? In *Cytomegaloviruses from molecular pathogenesis to intervention*. Reddehase, M. J., Caister Academic Press: Norfolk, 2, **2013**, 424-449
- Plotkin, S. A. Cytomegalovirus vaccines. *J Infect Dis*, 144, 5, **1981**, 494-495
- Plotkin, S. A.; Farquhar, J. and Horberger, E. Clinical trials of immunization with the Towne 125 strain of human cytomegalovirus. *J Infect Dis*, 134, 5, **1976**, 470-475
- Plotkin, S. A.; Furukawa, T.; Zygraich, N. and Huygelen, C. Candidate cytomegalovirus strain for human vaccination. *Infect Immun*, 12, 3, **1975**, 521-527
- Polo, J. M.; Belli, B. A.; Driver, D. A.; Frolov, I.; Sherrill, S.; Hariharan, M. J.; Townsend, K.; Perri, S.; Mento, S. J.; Jolly, D. J.; Chang, S. M.; Schlesinger, S. and Dubensky, T. W., Jr. Stable alphavirus packaging cell lines for Sindbis virus and Semliki Forest virus-derived vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 8, **1999**, 4598-4603
- Poncet, D.; Pauleau, A. L.; Szabadkai, G.; Voza, A.; Scholz, S. R.; Le Bras, M.; Briere, J. J.; Jalil, A.; Le Moigne, R.; Brenner, C.; Hahn, G.; Wittig, I.; Schagger, H.; Lemaire, C.; Bianchi, K.; Souquere, S.; Pierron, G.; Rustin, P.; Goldmacher, V. S.; Rizzuto, R.; Palmieri, F. and Kroemer, G. Cytotoxic effects of the cytomegalovirus-encoded apoptosis inhibitory protein vMIA. *J Cell Biol*, 174, 7, **2006**, 985-996

- Pöttsch, S.; Spindler, N.; Wiegers, A. K.; Fisch, T.; Rucker, P.; Sticht, H.; Grieb, N.; Baroti, T.; Weisel, F.; Stamminger, T.; Martin-Parras, L.; Mach, M. and Winkler, T. H. B cell repertoire analysis identifies new antigenic domains on glycoprotein B of human cytomegalovirus which are target of neutralizing antibodies. *PLoS Pathog*, 7, 8, **2011**, e1002172
- Puck, T. T.; Cieciura, S. J. and Robinson, A. Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J Exp Med*, 108, 6, **1958**, 945-956
- Qian, Z.; Leung-Pineda, V.; Xuan, B.; Piwnica-Worms, H. and Yu, D. Human cytomegalovirus protein pUL117 targets the mini-chromosome maintenance complex and suppresses cellular DNA synthesis. *PLoS Pathog*, 6, 3, **2010**, e1000814
- Radha, R.; Jordan, S.; Puliyaanda, D.; Bunnapradist, S.; Petrosyan, A.; Amet, N. and Toyoda, M. Cellular immune responses to cytomegalovirus in renal transplant recipients. *Am J Transplant*, 5, 1, **2005**, 110-117
- Rahbar, A.; Orrego, A.; Peredo, I.; Dzabic, M.; Wolmer-Solberg, N.; Straat, K.; Stragliotto, G. and Soderberg-Naucler, C. Human cytomegalovirus infection levels in glioblastoma multiforme are of prognostic value for survival. *J Clin Virol*, 57, 1, **2013**, 36-42
- Reap, E. A.; Dryga, S. A.; Morris, J.; Rivers, B.; Norberg, P. K.; Olmsted, R. A. and Chulay, J. D. Cellular and humoral immune responses to alphavirus replicon vaccines expressing cytomegalovirus pp65, IE1, and gB proteins. *Clin Vaccine Immunol*, 14, 6, **2007**, 748-755
- Reinke, P.; Prosch, S.; Kern, F. and Volk, H. D. Mechanisms of human cytomegalovirus (HCMV) (re)activation and its impact on organ transplant patients. *Transpl Infect Dis*, 1, 3, **1999**, 157-164
- Reusser, P.; Cathomas, G.; Attenhofer, R.; Tamm, M. and Thiel, G. Cytomegalovirus (CMV)-specific T cell immunity after renal transplantation mediates protection from CMV disease by limiting the systemic virus load. *J Infect Dis*, 180, 2, **1999**, 247-253
- Reyda, S.; Büscher, N.; Tenzer, S. and Plachter, B. Proteomic analyses of human cytomegalovirus strain AD169 derivatives reveal highly conserved patterns of viral and cellular proteins in infected fibroblasts. *Viruses*, 6, 1, **2014a**, 172-188
- Reyda, S.; Tenzer, S.; Navarro, P.; Gebauer, W.; Saur, M.; Krauter, S.; Büscher, N. and Plachter, B. The tegument protein pp65 of human cytomegalovirus acts as an optional scaffold protein that optimizes protein uploading into viral particles. *J Virol*, 88, 17, **2014b**, 9633-9646
- Riddell, S. R. and Greenberg, P. D. Therapeutic reconstitution of human viral immunity by adoptive transfer of cytotoxic T lymphocyte clones. *Curr Top Microbiol Immunol*, 189, **1994**, 9-34
- Riddell, S. R. and Greenberg, P. D. Principles for adoptive T cell therapy of human viral diseases. *Annu Rev Immunol*, 13, **1995**, 545-586
- Riddell, S. R.; Watanabe, K. S.; Goodrich, J. M.; Li, C. R.; Agha, M. E. and Greenberg, P. D. Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science*, 257, 5067, **1992**, 238-241
- Robertson, J. S.; Bootman, J. S.; Newman, R.; Oxford, J. S.; Daniels, R. S.; Webster, R. G. and Schild, G. C. Structural changes in the haemagglutinin which accompany egg adaptation of an influenza A(H1N1) virus. *Virology*, 160, 1, **1987**, 31-37
- Robertson, J. S.; Cook, P.; Attwell, A. M. and Williams, S. P. Replicative advantage in tissue culture of egg-adapted influenza virus over tissue-culture derived virus: implications for vaccine manufacture. *Vaccine*, 13, 16, **1995**, 1583-1588
- Roby, C. and Gibson, W. Characterization of phosphoproteins and protein kinase activity of virions, noninfectious enveloped particles, and dense bodies of human cytomegalovirus. *J Virol*, 59, 3, **1986**, 714-727
- Roizman, B. Multiplication. In *Medical Microbiology*. Baron, S.: Galveston (TX), **1996**,

- Roizman, B.; Carmichael, L. E.; Deinhardt, F.; de-The, G.; Nahmias, A. J.; Plowright, W.; Rapp, F.; Sheldrick, P.; Takahashi, M. and Wolf, K. Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature, and taxonomy. The Herpesvirus Study Group, the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology*, 16, 4, **1981**, 201-217
- Rosen, H. R.; Benner, K. G.; Flora, K. D.; Rabkin, J. M.; Orloff, S. L.; Olyaei, A. and Chou, S. Development of ganciclovir resistance during treatment of primary cytomegalovirus infection after liver transplantation. *Transplantation*, 63, 3, **1997**, 476-478
- Ross, D. S.; Dollard, S. C.; Victor, M.; Sumartojo, E. and Cannon, M. J. The epidemiology and prevention of congenital cytomegalovirus infection and disease: activities of the Centers for Disease Control and Prevention Workgroup. *J Womens Health (Larchmt)*, 15, 3, **2006**, 224-229
- Rowe, W. P.; Hartley, J. W.; Waterman, S.; Turner, H. C. and Huebner, R. J. Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. *Proc Soc Exp Biol Med*, 92, 2, **1956**, 418-424
- Ryckman, B. J.; Jarvis, M. A.; Drummond, D. D.; Nelson, J. A. and Johnson, D. C. 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, 2, **2006**, 710-722
- Saccoccio, F. M.; Sauer, A. L.; Cui, X.; Armstrong, A. E.; Habib el, S. E.; Johnson, D. C.; Ryckman, B. J.; Klingelhutz, A. J.; Adler, S. P. and McVoy, M. A. Peptides from cytomegalovirus UL130 and UL131 proteins induce high titer antibodies that block viral entry into mucosal epithelial cells. *Vaccine*, 29, 15, **2011**, 2705-2711
- Saffert, R. T. and Kalejta, R. F. Inactivating a cellular intrinsic immune defense mediated by Daxx is the mechanism through which the human cytomegalovirus pp71 protein stimulates viral immediate-early gene expression. *J Virol*, 80, 8, **2006**, 3863-3871
- Salk, J. E.; Youngner, J. S. and Ward, E. N. Use of color change of phenol red as the indicator in titrating poliomyelitis virus or its antibody in a tissue-culture system. *Am J Hyg*, 60, 2, **1954**, 214-230
- Salvant, B. S.; Fortunato, E. A. and Spector, D. H. Cell cycle dysregulation by human cytomegalovirus: influence of the cell cycle phase at the time of infection and effects on cyclin transcription. *J Virol*, 72, 5, **1998**, 3729-3741
- Samina, I.; Havenga, M.; Koudstaal, W.; Khinich, Y.; Koldijk, M.; Malkinson, M.; Simanov, M.; Perl, S.; Gijsbers, L.; Weverling, G. J.; Uytdehaag, F. and Goudsmit, J. Safety and efficacy in geese of a PER.C6-based inactivated West Nile virus vaccine. *Vaccine*, 25, 49, **2007**, 8338-8345
- Sampath, G.; Reddy, S. V.; Rao, M. L.; Rao, Y. U. and Palaniappan, C. An immunogenicity study of a newly introduced purified Vero cell rabies vaccine (Abhayrab) manufactured in India. *Vaccine*, 23, 7, **2005**, 897-900
- Sanchez, V.; Greis, K. D.; Sztul, E. and Britt, W. J. Accumulation of virion tegument and envelope proteins in a stable cytoplasmic compartment during human cytomegalovirus replication: characterization of a potential site of virus assembly. *J Virol*, 74, 2, **2000a**, 975-986
- Sanchez, V.; Sztul, E. and Britt, W. J. Human cytomegalovirus pp28 (UL99) localizes to a cytoplasmic compartment which overlaps the endoplasmic reticulum-golgi-intermediate compartment. *J Virol*, 74, 8, **2000b**, 3842-3851
- Sanders, B. P.; Edo-Matas, D.; Custers, J. H.; Koldijk, M. H.; Klaren, V.; Turk, M.; Luitjens, A.; Bakker, W. A.; Uytdehaag, F.; Goudsmit, J.; Lewis, J. A. and Schuitemaker, H. PER.C6((R)) cells as a serum-free suspension cell platform for the production of high titer poliovirus: a potential low cost of goods option for world supply of inactivated poliovirus vaccine. *Vaccine*, 31, 5, **2013**, 850-856
- Sarisky, R. T. and Hayward, G. S. Evidence that the UL84 gene product of human cytomegalovirus is essential for promoting oriLyt-dependent DNA replication and

- formation of replication compartments in cotransfection assays. *J Virol*, 70, 11, **1996**, 7398-7413
- Sauer, C.; Klobuch, S.; Herr, W.; Thomas, S. and Plachter, B. Subviral dense bodies of human cytomegalovirus stimulate maturation and activation of monocyte-derived immature dendritic cells. *J Virol*, 87, 20, **2013**, 11287-11291
- Schaufflinger, M.; Fischer, D.; Schreiber, A.; Chevillotte, M.; Walther, P.; Mertens, T. and von Einem, J. The tegument protein UL71 of human cytomegalovirus is involved in late envelopment and affects multivesicular bodies. *J Virol*, 85, 8, **2011**, 3821-3832
- Schiedner, G.; Hertel, S.; Bialek, C.; Kewes, H.; Waschutzka, G. and Volpers, C. Efficient and reproducible generation of high-expressing, stable human cell lines without need for antibiotic selection. *BMC Biotechnol*, 8, **2008**, 13
- Schiedner, G.; Hertel, S. and Kochanek, S. Efficient transformation of primary human amniocytes by E1 functions of Ad5: generation of new cell lines for adenoviral vector production. *Hum Gene Ther*, 11, 15, **2000**, 2105-2116
- Schleiss, M. R. Cytomegalovirus in the neonate: immune correlates of infection and protection. *Clin Dev Immunol*, 2013, **2013**, 501801
- Schubert, A.; Ehlert, K.; Schuler-Luettmann, S.; Gentner, E.; Mertens, T. and Michel, D. Fast selection of maribavir resistant cytomegalovirus in a bone marrow transplant recipient. *BMC Infect Dis*, 13, **2013**, 330
- Scrivano, L.; Sinzger, C.; Nitschko, H.; Koszinowski, U. H. and Adler, B. HCMV spread and cell tropism are determined by distinct virus populations. *PLoS Pathog*, 7, 1, **2011**, e1001256
- Seo, J. Y. and Britt, W. J. Sequence requirements for localization of human cytomegalovirus tegument protein pp28 to the virus assembly compartment and for assembly of infectious virus. *J Virol*, 80, 11, **2006**, 5611-5626
- Seo, J. Y. and Britt, W. J. Cytoplasmic envelopment of human cytomegalovirus requires the postlocalization function of tegument protein pp28 within the assembly compartment. *J Virol*, 81, 12, **2007**, 6536-6547
- Seo, S. and Boeckh, M. Clinical Cytomegalovirus Research: Haematopoietic Cell Transplantation In *Cytomegaloviruses from molecular pathogenesis to intervention*. Reddehase, M. J., Caister Academic Press: Norfolk, 2, **2013**, 337-353
- Sester, M.; Sester, U.; Gartner, B. C.; Girndt, M.; Meyerhans, A. and Kohler, H. Dominance of virus-specific CD8 T cells in human primary cytomegalovirus infection. *J Am Soc Nephrol*, 13, 10, **2002**, 2577-2584
- Sester, U.; Gartner, B. C.; Wilkens, H.; Schwaab, B.; Wossner, R.; Kindermann, I.; Girndt, M.; Meyerhans, A.; Mueller-Lantzsch, N.; Schaefers, H. J.; Sybrecht, G. W.; Kohler, H. and Sester, M. Differences in CMV-specific T-cell levels and long-term susceptibility to CMV infection after kidney, heart and lung transplantation. *Am J Transplant*, 5, 6, **2005**, 1483-1489
- Sheets, R. (2000). DRAFT: History and Characterization of the Vero Cell Line. 1-12.
- Shimamura, M.; Murphy-Ullrich, J. E. and Britt, W. J. Human cytomegalovirus induces TGF-beta1 activation in renal tubular epithelial cells after epithelial-to-mesenchymal transition. *PLoS Pathog*, 6, 11, **2010**, e1001170
- Shizuya, H.; Birren, B.; Kim, U. J.; Mancino, V.; Slepak, T.; Tachiiri, Y. and Simon, M. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 18, **1992**, 8794-8797
- Sinzger, C.; Digel, M. and Jahn, G. Cytomegalovirus cell tropism. *Curr Top Microbiol Immunol*, 325, **2008a**, 63-83
- Sinzger, C.; Hahn, G.; Digel, M.; Katona, R.; Sampaio, K. L.; Messerle, M.; Hengel, H.; Koszinowski, U.; Brune, W. and Adler, B. Cloning and sequencing of a highly productive, endotheliotropic virus strain derived from human cytomegalovirus TB40/E. *J Gen Virol*, 89, 2, **2008b**, 359-368

- Sinzger, C.; Kahl, M.; Laib, K.; Klingel, K.; Rieger, P.; Plachter, B. and Jahn, G. Tropism of human cytomegalovirus for endothelial cells is determined by a post-entry step dependent on efficient translocation to the nucleus. *J Gen Virol*, 81, 12, **2000**, 3021-3035
- Sinzger, C.; Schmidt, K.; Knapp, J.; Kahl, M.; Beck, R.; Waldman, J.; Hebart, H.; Einsele, H. and Jahn, G. Modification of human cytomegalovirus tropism through propagation in vitro is associated with changes in the viral genome. *J Gen Virol*, 80, 11, **1999**, 2867-2877
- Slezak, S. L.; Bettinotti, M.; Selleri, S.; Adams, S.; Marincola, F. M. and Stroncek, D. F. CMV pp65 and IE-1 T cell epitopes recognized by healthy subjects. *J Transl Med*, 5, **2007**, 17
- Smith, J. D. and de Harven, E. Herpes simplex virus and human cytomegalovirus replication in WI-38 cells. II. An ultrastructural study of viral penetration. *J Virol*, 14, 4, **1974**, 945-956
- Sodeik, B.; Ebersold, M. W. and Helenius, A. Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J Cell Biol*, 136, 5, **1997**, 1007-1021
- Soderberg, C.; Giugni, T. D.; Zaia, J. A.; Larsson, S.; Wahlberg, J. M. and Moller, E. CD13 (human aminopeptidase N) mediates human cytomegalovirus infection. *J Virol*, 67, 11, **1993**, 6576-6585
- Soroceanu, L. and Cobbs, C. S. Is HCMV a tumor promoter? *Virus Res*, 157, 2, **2011a**, 193-203
- Soroceanu, L.; Matlaf, L.; Bezrookove, V.; Harkins, L.; Martinez, R.; Greene, M.; Soteropoulos, P. and Cobbs, C. S. Human cytomegalovirus US28 found in glioblastoma promotes an invasive and angiogenic phenotype. *Cancer Res*, 71, 21, **2011b**, 6643-6653
- Spector, D. H. Human cytomegalovirus riding the cell cycle. *Med Microbiol Immunol*, 204, 3, **2015**, 409-419
- Spector, D. J. The pattern of integration of viral DNA sequences in the adenovirus 5-transformed human cell line 293. *Virology*, 130, 2, **1983**, 533-538
- Spector, D. J. and Tevethia, M. J. Identification of a human cytomegalovirus virus DNA segment that complements an adenovirus 5 immediate early mutant. *Virology*, 151, 2, **1986**, 329-338
- Staras, S. A.; Dollard, S. C.; Radford, K. W.; Flanders, W. D.; Pass, R. F. and Cannon, M. J. Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988-1994. *Clin Infect Dis*, 43, 9, **2006**, 1143-1151
- Steininger, C. Novel therapies for cytomegalovirus disease. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*, 2, 1, **2007**, 53-72
- Stenberg, R. M. The human cytomegalovirus major immediate-early gene. *Intervirology*, 39, 5-6, **1996**, 343-349
- Stenberg, R. M.; Thomsen, D. R. and Stinski, M. F. Structural analysis of the major immediate early gene of human cytomegalovirus. *J Virol*, 49, 1, **1984**, 190-199
- Stern-Ginossar, N.; Weisburd, B.; Michalski, A.; Le, V. T.; Hein, M. Y.; Huang, S. X.; Ma, M.; Shen, B.; Qian, S. B.; Hengel, H.; Mann, M.; Ingolia, N. T. and Weissman, J. S. Decoding human cytomegalovirus. *Science*, 338, 6110, **2012**, 1088-1093
- Stoelben, S.; Arns, W.; Renders, L.; Hummel, J.; Muhlfeld, A.; Stangl, M.; Fischereder, M.; Gwinner, W.; Suwelack, B.; Witzke, O.; Durr, M.; Beelen, D. W.; Michel, D.; Lischka, P.; Zimmermann, H.; Rubsamen-Schaeff, H. and Budde, K. Preemptive treatment of Cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients with letermovir: results of a Phase 2a study. *Transpl Int*, 27, 1, **2014**, 77-86
- Stoker, M. Characteristics of normal and transformed clones arising from BHK21 cells exposed to polyoma virus. *Virology*, 18, **1962**, 649-651
- Stoker, M. and Macpherson, I. Syrian Hamster Fibroblast Cell Line Bhk21 and Its Derivatives. *Nature*, 203, **1964**, 1355-1357
- Sylwester, A. W.; Mitchell, B. L.; Edgar, J. B.; Taormina, C.; Pelte, C.; Ruchti, F.; Sleath, P. R.; Grabstein, K. H.; Hosken, N. A.; Kern, F.; Nelson, J. A. and Picker, L. J.

- Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J Exp Med*, 202, 5, **2005**, 673-685
- Talbot, P. and Almeida, J. D. Human cytomegalovirus: purification of enveloped virions and dense bodies. *J Gen Virol*, 36, 2, **1977**, 345-349
- Tavalai, N. and Stamminger, T. Interplay between Herpesvirus Infection and Host Defense by PML Nuclear Bodies. *Viruses*, 1, 3, **2009**, 1240-1264
- Terrazzini, N. and Kern, F. Cell-mediated immunity to human CMV infection: a brief overview. *F1000Prime Rep*, 6, **2014**, 28
- Tevethia, M. J.; Spector, D. J.; Leisure, K. M. and Stinski, M. F. Participation of two human cytomegalovirus immediate early gene regions in transcriptional activation of adenovirus promoters. *Virology*, 161, 2, **1987**, 276-285
- Tjio, J. H. and Puck, T. T. Genetics of somatic mammalian cells. II. Chromosomal constitution of cells in tissue culture. *J Exp Med*, 108, 2, **1958**, 259-268
- Toovey, S. Preventing rabies with the Verorab vaccine: 1985-2005 Twenty years of clinical experience. *Travel Med Infect Dis*, 5, 6, **2007**, 327-348
- Tooze, J.; Hollinshead, M.; Reis, B.; Radsak, K. and Kern, H. Progeny vaccinia and human cytomegalovirus particles utilize early endosomal cisternae for their envelopes. *Eur J Cell Biol*, 60, 1, **1993**, 163-178
- Topilko, A. and Michelson, S. Morphological and cytochemical analysis of human cytomegalovirus inoculum: correlation of free particles in inoculum with counterparts in infected cells. *Res Virol*, 145, 2, **1994**, 65-73
- van Wielink, R.; Kant-Eenbergen, H. C.; Harmsen, M. M.; Martens, D. E.; Wijffels, R. H. and Coco-Martin, J. M. Adaptation of a Madin-Darby canine kidney cell line to suspension growth in serum-free media and comparison of its ability to produce avian influenza virus to Vero and BHK21 cell lines. *J Virol Methods*, 171, 1, **2011**, 53-60
- Varnum, S. M.; Streblow, D. N.; Monroe, M. E.; Smith, P.; Auberry, K. J.; Pasa-Tolic, L.; Wang, D.; Camp, D. G., 2nd; Rodland, K.; Wiley, S.; Britt, W.; Shenk, T.; Smith, R. D. and Nelson, J. A. Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *J Virol*, 78, 20, **2004**, 10960-10966
- Vellinga, J.; Smith, J. P.; Lipiec, A.; Majhen, D.; Lemckert, A.; van Ooij, M.; Ives, P.; Yallop, C.; Custers, J. and Havenga, M. Challenges in manufacturing adenoviral vectors for global vaccine product deployment. *Hum Gene Ther*, 25, 4, **2014**, 318-327
- Vergara, R.; Tregnaghi, M.; Ussher, J.; Navarro, S.; Ruttimann, R.; Potin, M.; Wolter, J. and Schuerman, L. Reduced-antigen-content-diphtheria-tetanus-acellular-pertussis and inactivated polio vaccine as a booster for adolescents 10 to 14 years of age. *Eur J Pediatr*, 164, 6, **2005**, 377-382
- Viswanathan, K.; Smith, M. S.; Malouli, D.; Mansouri, M.; Nelson, J. A. and Fruh, K. BST2/Tetherin enhances entry of human cytomegalovirus. *PLoS Pathog*, 7, 11, **2011**, e1002332
- Vlecken, D. H.; Pelgrim, R. P.; Ruminski, S.; Bakker, W. A. and van der Pol, L. A. Comparison of initial feasibility of host cell lines for viral vaccine production. *J Virol Methods*, 193, 1, **2013**, 28-41
- Wang, D. and Shenk, T. Human cytomegalovirus UL131 open reading frame is required for epithelial cell tropism. *J Virol*, 79, 16, **2005a**, 10330-10338
- Wang, D.; Yu, Q. C.; Schroer, J.; Murphy, E. and Shenk, T. Human cytomegalovirus uses two distinct pathways to enter retinal pigmented epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 50, **2007**, 20037-20042
- Wang, X.; Huang, D. Y.; Huong, S. M. and Huang, E. S. Integrin alphavbeta3 is a coreceptor for human cytomegalovirus. *Nat Med*, 11, 5, **2005b**, 515-521
- Wang, X.; Huong, S. M.; Chiu, M. L.; Raab-Traub, N. and Huang, E. S. Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature*, 424, 6947, **2003**, 456-461

- White, E. A. and Spector, D. H. Early viral gene expression and function. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Arvin, A., Campadelli-Fiume, G., Mocarski, E., Moore, P. S., Roizman, B., Whitley, R. and Yamanishi, K.: Cambridge, **2007**,
- Wiebusch, L. and Hagemeyer, C. Human cytomegalovirus 86-kilodalton IE2 protein blocks cell cycle progression in G(1). *J Virol*, 73, 11, **1999**, 9274-9283
- Wiebusch, L. and Hagemeyer, C. Use of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine labelling and flow cytometry to study cell cycle-dependent regulation of human cytomegalovirus gene expression. *Methods Mol Biol*, 1119, **2014**, 123-132
- Wilkinson, G. W.; Kelly, C.; Sinclair, J. H. and Rickards, C. Disruption of PML-associated nuclear bodies mediated by the human cytomegalovirus major immediate early gene product. *J Gen Virol*, 79, 5, **1998**, 1233-1245
- Wille, P. T.; Knoche, A. J.; Nelson, J. A.; Jarvis, M. A. and Johnson, D. C. A human cytomegalovirus gO-null mutant fails to incorporate gH/gL into the virion envelope and is unable to enter fibroblasts and epithelial and endothelial cells. *J Virol*, 84, 5, **2010**, 2585-2596
- Womack, A. and Shenk, T. Human cytomegalovirus tegument protein pUL71 is required for efficient virion egress. *MBio*, 1, 5, **2010**, e00282-10
- Woodhall, D. L.; Groves, I. J.; Reeves, M. B.; Wilkinson, G. and Sinclair, J. H. Human Daxx-mediated repression of human cytomegalovirus gene expression correlates with a repressive chromatin structure around the major immediate early promoter. *J Biol Chem*, 281, 49, **2006**, 37652-37660
- Wright, J. F.; Kurosky, A.; Pryzdial, E. L. and Wasi, S. Host cellular annexin II is associated with cytomegalovirus particles isolated from cultured human fibroblasts. *J Virol*, 69, 8, **1995**, 4784-4791
- Wright, J. F.; Kurosky, A. and Wasi, S. An endothelial cell-surface form of annexin II binds human cytomegalovirus. *Biochem Biophys Res Commun*, 198, 3, **1994**, 983-989
- Wussow, F.; Chiappesi, F.; Martinez, J.; Campo, J.; Johnson, E.; Flechsig, C.; Newell, M.; Tran, E.; Ortiz, J.; La Rosa, C.; Herrmann, A.; Longmate, J.; Chakraborty, R.; Barry, P. A. and Diamond, D. J. Human cytomegalovirus vaccine based on the envelope gH/gL pentamer complex. *PLoS Pathog*, 10, 11, **2014**, e1004524
- Xu, Y.; Cei, S. A.; Huete, A. R. and Pari, G. S. Human cytomegalovirus UL84 insertion mutant defective for viral DNA synthesis and growth. *J Virol*, 78, 19, **2004**, 10360-10369
- Xu, Y.; Colletti, K. S. and Pari, G. S. Human cytomegalovirus UL84 localizes to the cell nucleus via a nuclear localization signal and is a component of viral replication compartments. *J Virol*, 76, 17, **2002**, 8931-8938
- Yallop, C. PER.C6 cells for the Manufacture of Biopharmaceutical Proteins. In *Modern biopharmaceuticals : design, development and optimization*. Crick, F. and Knäblein, J., Wiley-VCH: Weinheim ; Chichester, 3, **2005**,
- Yamamoto, A. Y.; Mussi-Pinhata, M. M.; Boppana, S. B.; Novak, Z.; Wagatsuma, V. M.; Oliveira Pde, F.; Duarte, G. and Britt, W. J. Human cytomegalovirus reinfection is associated with intrauterine transmission in a highly cytomegalovirus-immune maternal population. *Am J Obstet Gynecol*, 202, 3, **2010**, 297
- Yasumura, Y. and Kawakita, Y. Studies on SV40 in tissue culture - preliminary step for cancer research in vitro. *Nihon Rinsho Geka Gakkai Zasshi*, 21, **1963**, 1201-1215
- Zhang, C.; Buchanan, H.; Andrews, W.; Evans, A. and Pass, R. F. Detection of cytomegalovirus infection during a vaccine clinical trial in healthy young women: seroconversion and viral shedding. *J Clin Virol*, 35, 3, **2006**, 338-342
- Zhao, P.; Ma, D.; Xue, F.; Ji, C.; Wang, S.; Zhang, X.; Zhou, Y. and Yu, X. Seroprevalence and risk factors of human cytomegalovirus infection in the eastern Chinese population. *Arch Virol*, 154, 4, **2009**, 561-564
- Zhou, M.; Lanchy, J. M. and Ryckman, B. J. Human Cytomegalovirus gH/gL/gO Promotes the Fusion Step of Entry into All Cell Types, whereas gH/gL/UL128-131

Broadens Virus Tropism through a Distinct Mechanism. *J Virol*, 89, 17, **2015**, 8999-9009

Danksagung

Erklärung

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Experimente wurden in der Zeit von Dezember 2011 bis Dezember 2015 am Institut für Virologie der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz, Institutsleiter Prof. Dr. Matthias Reddehase, unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Bodo Plachter durchgeführt.

Die Arbeit wurde von der Cevec Pharmaceuticals GmbH sowie von der Vakzine Projekt Management GmbH unterstützt.

Teilaspekte der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Krömmelbein, N.; Wiebusch, L.; Schiedner, G.; Büscher, N.; Sauer, C.; Florin, L.; Sehn, E.; Wolfrum, U. and Plachter, B. Adenovirus E1A/E1B Transformed Amniotic Fluid Cells Support Human Cytomegalovirus Replication. *Viruses*, 8, 2, **2016**, 37, doi:10.3390/v8020037

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Doktorarbeit selbständig verfasst und ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Mainz, den 17.02.2016

Natascha Krömmelbein

Lebenslauf