

Aus dem medizinischen Zentrum für Hygiene und
Medizinische Mikrobiologie der Philipps- Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. H.-D. Klenk
Institut für Virologie
Direktor: Prof. Dr. H.-D. Klenk

**Charakterisierung essentieller Domänen
des Glykoproteins H des
Humanen Cytomegalievirus**

Inaugural- Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Humanbiologie
(Dr. rer. physiol.)

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Stephan Rinn
aus Marburg/Lahn

Marburg/Lahn 2002

Vom Fachbereich Medizin der Philipps- Universität als Dissertation

angenommen am: 05.12.2002

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. K. Radsak

Correferent: Prof. Dr. H.- P. Elsässer

1. Abkürzungsverzeichnis	1
2. Zusammenfassung der Ergebnisse	2
3. Einleitung	4
3.1 Taxonomie.....	4
3.2 Medizinische Aspekte der HCMV- Infektion	5
3.2.1 Epidemiologie	5
3.2.2 Krankheitsverlauf.....	6
3.2.3 Therapeutische Möglichkeiten	6
3.3 Molekularbiologie des HCMV.....	7
3.3.1 Genomstruktur	7
3.3.2 Virionstruktur.....	8
3.3.3 Viraler Infektionszyklus.....	9
3.3.4 Morphogenese des Humanen Cytomegalievirus.....	11
3.4 Glykoproteine der Virushülle.....	12
3.5 Das Glykoprotein H des Humanen Cytomegalievirus	15
3.5.1 Struktur des Glykoproteins H.....	15
3.5.2 Reifung und Transport des Glykoproteins H	16
3.5.3 Funktionen des Glykoproteins H	16
3.6 Mutanten des Humanen Cytomegalievirus	17
3.6.1 Herstellung von Virusmutanten durch Insertionsmutagenese	17
3.6.2 Bacterial Artificial Chromosomes (BACs).....	18
3.6.3 Komplementierende Zellsysteme.....	19
4. Zielsetzung der Arbeit.....	22
5. Material	23
5.1 Geräte	23
5.2 Verbrauchsmaterialien	23
5.3 Chemikalien und Biochemikalien	24
5.4 Detergentien	26
5.5 Enzyme.....	26
5.6 Antibiotika	26
5.7 Kits	27
5.8 Kulturmediengrundstoffe	27
5.9 Antikörper	28

5.10 Medien zur Anzucht von Bakterien	29
5.11 Puffer	30
5.12 Zellen	31
5.12.1 Primäre humane Lungenfibroblasten (MRC5)	31
5.12.2 COS7- Zellen	31
5.12.3 HEK293- Zellen	31
5.12.4 911E4- Zellen	31
5.12.5 Retrovirus- Verpackungszelllinie pt67	31
5.13 Virusstämme	31
5.14 Bakterienstämme	32
5.15 Plasmide, Cosmide und Bacterial Artificial Chromosomes (BACs)	32
5.16 Oligonukleotide	33
5.17 Rekombinante Proteine	34
6. Methoden	35
6.1 Molekularbiologische Methoden	35
6.1.1 Isolierung von Plasmid- DNA	35
6.1.2 Isolierung von BAC- DNA	35
6.1.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren	36
6.1.4 Restriktion von Nukleinsäuren	37
6.1.5 Agarosegelelektrophorese	37
6.1.6 Elution von DNA aus Agarosegelen	38
6.1.7 Dephosphorylierung linearer DNA- Fragmente	38
6.1.8 Auffüllreaktion überhängender 5'- Enden	38
6.1.9 Ligation von DNA- Fragmenten	38
6.1.10 Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> - Zellen	39
6.1.11 Transformation elektrokompenter Bakterien.	39
6.1.12 Polymerasekettenreaktion (PCR)	40
6.1.13 Reinigung von PCR- Produkten	41
6.1.14 Mutagenese durch rekombinante PCR	41
6.1.15 Mutagenese mittels Exo Mung Bean Deletion Kit	43
6.1.16 BAC- Mutagenese mit linearen Fragmenten	44
6.1.17 DNA- Sequenzierung	46
6.2 Zellbiologische Methoden	47
6.2.1 Kultivierung von humanen Fibroblasten und COS7- Zellen	47

6.2.2 Einfrieren/Auftauen von Zellen	48
6.2.3 Virusanzüchtung und Infektion von Zellen.....	48
6.2.4 Virustitration	49
6.2.5 Isolierung viraler DNA	49
6.2.6 Transiente Transfektion von COS7- Zellen	49
6.2.7 Transfektion von MRC5- Zellen mit BAC- DNA	50
6.2.8 Kotransfektion von MRC5- Zellen mit BAC- DNA und Expressionsplasmiden bzw. Cosmiden	51
6.3 Immunologische und proteinbiochemische Methoden	52
6.3.1 Aufreinigung eines spezifischen gH- Antikörpers.....	52
6.3.2 Fixierung und indirekte Immunfluoreszenz von Zellen.....	53
6.3.3 SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS- PAGE)	55
6.3.4 Immunoblot.....	56
7. Ergebnisse	59
7.1 Neutralisation der viralen Infektiosität durch gH- spezifische Antikörper.....	59
7.2 Herstellung eines HCMV- BAC mit einer funktionellen Deletion des gH- Gens	61
7.2.1 Herstellung des Rekombinationsplasmides pGem1 lzf-FIA-Kan-FIB.....	62
7.2.2 Herstellung eines replikationsdefizienten HCMV- BACs (HCMV- BAC Δ gHgf)	63
7.2.3 Nachweis der Replikationsdefizienz des HCMV- BAC Δ gHgf	64
7.3 Phänotypische Komplementation des HCMV- BAC Δ gHgf.....	65
7.3.1 Versuche zur Komplementation in stabilen gH- Transfektanten humaner Astrozytomzellen (U373).....	65
7.3.2 Komplementation unter Verwendung einer immortalisierten Fibroblasten- zelllinie.....	66
7.3.3 Versuche zur Komplementation unter Verwendung eines Retrovirussystems	66
7.3.4 Komplementation unter Verwendung von adenoviralen Helferviren.....	68
7.3.5 Phänotypische Komplementation durch transiente Expression von authentischem gH.....	69
7.4 Herstellung von Expressionsplasmiden mit gezielten Mutationen im gH- Gen	71
7.4.1 Deletion der Transmembrandomäne.....	71

7.4.2 Deletion des Signalpeptides	72
7.4.3 Deletionen innerhalb des gH- Gens	75
7.4.4 Mutation von potentiellen Glykosylierungsstellen des gH- Proteins.....	77
7.4.5 Überprüfung der Expression der mutagenisierten gH- Expressionsplasmide	77
7.4.6 Komplementation des HCMV- BAC Δ gHgfp durch Koexpression von mutagenisiertem gH- Protein	78
7.4.7 Übertrag infektiöser viraler Partikel.....	79
7.4.8 Nachweis von gH- und IE- Protein in grün fluoreszierenden Miniplaques	80
7.4.9 Nachweis von gH in grün fluoreszierenden Einzelzellen	82
7.4.10 Fluoreszenzimmunologischer Nachweis von gB in grün fluoreszierenden Zellen und Plaques	83
7.5 Herstellung und Charakterisierung einer Revertante des HCMV- BAC Δ gHgfp	85
7.5.1 Herstellung und Reinigung einer Revertante	85
7.5.2 Überprüfung der Revertante mittels „selektiver PCR“	86
7.5.3 Nachweis der Proteine gB, gH und IE in Plaques der Revertante	88
7.5.4 Wachstumskinetik der Revertante.....	89
8. Diskussion.....	91
8.1 Bestätigung des Glykoproteins H als essentielles Produkt	91
8.2 Phänotypische Komplementation im HCMV- System	92
8.3 Revertante des HCMV- BAC Δ gHgfp.....	93
8.4 Essentielle Domänen des gH.....	94
8.5 Weiterführende Untersuchungen	96
9. Literaturverzeichnis.....	98
Danksagung.....	111

1. Abkürzungsverzeichnis

AS/aa	Aminosäure
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
bp	Basenpaare
DMEM	Dulbeccos minimales essentielles Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FRT	Flp- Recombinase- Target site
gB	Glykoprotein B
gH	Glykoprotein H
gp	Glykoprotein
h.p.i.	Stunden nach Infektion
HCMV	Humanes Cytomegalievirus
i.E.	infektiöse Einheiten
IE	HCMV- immediately early- Protein
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Lsg.	Lösung
mab	monoklonaler Antikörper
moi	Multiplizität der Infektion (i.E./Zelle)
pab	polyklonaler Antikörper
PCR	Polymerasekettenreaktion
pp	Phosphoprotein
rER	rauhes endoplasmatisches Retikulum
rpm	Umdrehungen pro Minute
SP	Signalpeptid
TE	tubuläres Endosom
TM	Transmembrandomäne
U _L	nichtrepetitives langes Segment des HCMV- Genoms
U _S	nichtrepetitives kurzes Segment des HCMV- Genoms

2. Zusammenfassung der Ergebnisse

Das Glykoprotein H des HCMV ist innerhalb der Familie der Herpesviren hochkonserviert. Es hat vermutlich wichtige Funktionen bei der Fusion der Virushülle mit der Wirtszellmembran und von infizierten Zellen untereinander.

Um die Funktionen des Glykoproteins H zu untersuchen, wurde das codierende Gen UL75 funktionell deletiert. Dies wurde durch die *Bacterial Artificial Chromosome* (BAC)- Technik erreicht, die die gezielte Mutagenese des Virusgenoms in Bakterien ohne Wildtypkontamination erlaubt. Die funktionelle Deletion des gH- Gens im viralen Genom erfolgte durch Deletion von 846 bp innerhalb des gH- Gens und Einsetzen des Kanamycin- Resistenzmarkers. Das erhaltene HCMV- BAC Δ gHgf erwies sich erwartungsgemäß als replikationsdefizient.

Versuche, das HCMV- BAC Δ gHgf in stabilen gH- Transfektanten oder durch Koinfektion mit gH- exprimierenden adenoviralen bzw. retroviralen Helferviren phänotypisch zu komplementieren, blieben ohne Erfolg. Nach Kotransfektion des HCMV- BAC Δ gHgf mit einem Konstrukt zur Expression von authentischem gH in humane Fibroblasten wurde eine Runde der Virusvermehrung erreicht. Die in kotransfizierten Zellen gebildeten phänotypisch komplementierten viralen Partikel führten zur abortiven Infektion benachbarter Zellen und durch das Markergen für das *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) des HCMV- BAC Δ gHgf zur Ausbildung von grün fluoreszierenden Miniplaques.

Zur Identifizierung funktioneller Domänen des gH- Proteins wurden Konstrukte zur transienten Koexpression gezielt mutagenisierter gH- Derivate eingesetzt. Diese Versuche zeigten, dass nach gezielter Deletion der Transmembrandomäne, des Signalpeptides und der Aminosäuren 505–701 bzw. 306–701 des gH- Proteins die Miniplaquebildung ausblieb, d. h. durch die Mutationen waren funktionell essentielle Domänen entfernt worden.

Durch Deletion der Aminosäuren 609–701 sowie der Glykosylierungsstellen im Bereich der Aminosäuren 56-58, 63-65 und 68-71 des gH- Proteins wurde die Miniplaquebildung nicht beeinträchtigt, so dass davon ausgegangen werden kann, dass es sich bei diesen Bereichen nicht um essentielle Domänen handelt.

Durch Kotransfektion des HCMV- BAC Δ gHgfp mit dem Cosmid 1075 wurde eine Revertante generiert, die sich im Wachstumsverhalten nicht vom HCMV- wtBACgfp unterschied.

3. Einleitung

3.1 Taxonomie

Das humane Cytomegalievirus (HCMV) wird nach der Klassifikation des „Internationalen Komitees für Taxonomie“ in die Familie der Herpesviren eingeordnet (Roizman et al., 1981; Smith, 1956). Zu dieser Familie gehören über 100 Vertreter, von denen acht humanpathogen sind (Tab. 1).

Herpesviren weisen ein komplexes doppelsträngiges DNA- Genom und eine typische Morphologie auf. Das ikosaedrische Nukleokapsid, welches die DNA enthält, ist in eine Matrixschicht eingebettet und von einer Lipiddoppelmembran umgeben, in die eine Vielzahl viruskodierter Glykoproteine inseriert ist. Die Replikation der DNA und der Zusammenbau der Kapside erfolgt im Zellkern und die Reifung beinhaltet Knospungsprozesse an intrazellulären Membranen der Wirtszelle. Alle Herpesviren sind in der Lage, nach der Primärinfektion latent im Wirt zu persistieren.

Tabelle 1: Klassifizierung der humanpathogenen Herpesviren (Roizman et al, 1992).

<i>Subfamilie</i>	<i>Art</i>	<i>Ab- kürzung</i>	<i>Literatur</i>
α - <i>Herpesvirinae</i>	Herpes- Simplex Virus 1	HSV 1	(Gruter, 1924)
	Herpes- Simplex Virus 2	HSV 2	(Schneeweis, 1962)
	Varizella- Zoster Virus	VZV	(Dumas <i>et al.</i> , 1981)
β - <i>Herpesvirinae</i>	Humanes Cytomegalievirus	HCMV	(Smith, 1956)
	Humanes Herpesvirus 6	HHV 6	(Lindquister & Pellett, 1991)
	Humanes Herpesvirus 7	HHV 7	(Frenkel <i>et al.</i> , 1990)
γ - <i>Herpesvirinae</i>	Epstein- Barr Virus	EBV	(Epstein <i>et al.</i> , 1965)
	Humanes Herpesvirus 8	HHV 8	(Chang <i>et al.</i> , 1994)

Unterschiedliche Eigenschaften der einzelnen Vertreter der Herpesviren bezüglich der speziellen Interaktionen mit der Wirtszelle und des Ortes ihrer Persistenz haben zu einer Einteilung der Herpesviren in drei Unterfamilien geführt (Tab.1).

Die α -*Herpesviren* sind durch ihren Neurotropismus, ein breites Wirtsspektrum in Zellkultur und einen kurzen Replikationszyklus gekennzeichnet. Diese Viren, deren bekanntester Vertreter das Herpes Simplex Virus ist, persistieren in sensorischen Ganglien des Wirtes.

Die β -*Herpesviren*, zu denen das HCMV gehört, sind lymphotrop und zeichnen sich durch eine strikte Spezies- und Zelltypspezifität *in vitro* sowie einen langsamen Replikationszyklus aus. Sie können in verschiedenen Organen, wie z.B. der Niere und lymphoretikulären Zellen persistieren. Die Vergrößerung der infizierten Zellen ist verantwortlich für die Namensgebung (Zytomegalie).

Die Familie der ebenfalls lymphotropen γ -*Herpesviren* zeigt eine ausgeprägte Gewebsspezifität; sie infizieren vorwiegend B- oder T- Lymphozyten und persistieren auch in lymphoiden Geweben. Viren dieser Subfamilie, zu denen das Epstein- Barr Virus und das Kaposi- Sarkoma assoziierte Virus gehören, haben zudem onkogene Eigenschaften.

3.2 Medizinische Aspekte der HCMV- Infektion

3.2.1 Epidemiologie

Das Virus ist ubiquitär verbreitet und der Mensch ist das einzige Reservoir. Es wird über Körperflüssigkeiten bei engem Kontakt, bei Bluttransfusionen oder Transplantationen übertragen. Es persistiert nach der Primärinfektion lebenslang im Wirtsorganismus.

Die Durchseuchung korreliert mit dem Hygienestandard der untersuchten Bevölkerungsgruppe (Britt & Alford, 1996; Krech, 1973; Kumar & Nankervis, 1979). So liegt die Durchseuchung in den westlichen Ländern in der Gruppe der 20jährigen bei etwa 20 %, in der Gruppe der über 40jährigen bei 50- 80 %. In den sogenannten Entwicklungsländern lässt sich schon bei 90- 100 % der Kinder eine abgelaufene Infektion nachweisen.

3.2.2 Krankheitsverlauf

Der Immunstatus des Infizierten bestimmt den Verlauf der Infektion. Im immunkompetenten Menschen verläuft die Infektion meist symptomlos.

Im Falle einer Immundefizienz, z. B. im Gefolge einer entsprechenden Therapie nach Transplantationen, kann es durch eine Primärinfektion oder die Reaktivierung des persistierenden Virus zu schweren Erkrankungen wie Lungenentzündung oder Hepatitis kommen, was zur Abstoßung des Organs oder sogar zum Tod führen kann. Gleiches gilt für Patienten, deren Immunsystem durch eine Infektion mit dem humanen Immundefizienzvirus (HIV) geschwächt ist. Die durch HCMV verursachte Form der Lungenentzündung (interstitielle Pneumonie) stellt in dieser Gruppe eine der häufigsten Todesursachen dar (Macher et al., 1983).

Eine weitere Gefährdung durch das HCMV stellt die kongenitale Infektion dar. Vor allem die Primärinfektion der Mutter führt in 10 % der Fälle zu bleibenden Schäden des Neugeborenen wie Wachstumsstörungen, Taubheit und Lernbehinderungen (Stagno, 1986). Findet die Infektion in einer frühen Phase der Schwangerschaft statt, kann es zum kongenitalen Cytomegaliesyndrom kommen, der schwersten Form der pränatalen HCMV- Infektionen, bei der 20- 30 % der Kinder bereits im ersten Lebensjahr sterben. Eine Reaktivierung des latenten Virus während der Schwangerschaft führt ebenso wie die perinatale Infektion seltener zur Schädigung des Kindes.

3.2.3 Therapeutische Möglichkeiten

Als antivirales Chemotherapeutikum steht Ganciclovir (9-[1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl]guanin) zur Verfügung. Es wird durch eine viruseigene Kinase (pUL97) in infizierten Zellen aktiviert (Sullivan *et al.*, 1992) und wirkt als Inhibitor der viralen DNA- Polymerase (Matthews & Boehme, 1988; Oram & Herold, 1998). Foscarnet (Phosphoameisensäure) oder Cidofovir (ein Nukleotidanalogen, (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosine) werden ebenfalls als Inhibitoren der viralen Polymerase eingesetzt, sind allerdings aufgrund ihrer Nebenwirkungen nur bedingt geeignet. Ein weiteres Problem, das die therapeutischen Möglichkeiten einschränkt, sind virale Resistenzentwicklungen (Mascolini, 1996).

Ein wirksamer Impfstoff gegen HCMV existiert bislang nicht. Es wurden in der Vergangenheit Lebendimpfstoffe auf der Basis der attenuierten Laborstämme Towne und AD169 an Transplantierten getestet, die jedoch keinen ausreichenden Schutz gegen Überinfektionen induzierten (Adler et al., 1995; Plotkin et al., 1990). Neue Strategien beinhalten die Entwicklung sogenannter Teilvakzine, die rekombinante HCMV- Hüllmembran- oder Matrixproteine, z.B. gB, pp65 oder gH enthalten oder die Verwendung von in Vektoren inserierten HCMV- Genen (Plotkin, 2001). Der Wert dieser neuen Generation von Impfstoffen muss abgewartet werden.

3.3 Molekularbiologie des HCMV

3.3.1 Genomstruktur

Das Genom des HCMV besteht aus einer doppelsträngigen, linearen DNA von etwa 230 Kilobasenpaaren (kbp) Länge und einem GC- Gehalt von etwa 59 %. Damit ist es das größte bekannte Genom humanpathogener Viren (Chee *et al.*, 1990). Es weist zwei Abschnitte auf, ein nichtrepetitives langes (U_L) und ein nichtrepetitives kurzes Segment (U_S), die von repetitiven Sequenzen eingerahmt sind (Chee *et al.*, 1990; Abb. 1). Diese können jeweils in beiden Orientierungen zueinander vorliegen, so dass sich vier Isoformen des Genoms ergeben. Diese Isoformen werden in äquimolaren Verteilungen in jeder Viruspopulation gefunden (Oram *et al.*, 1982). In Abb. 1 ist der als "P" definierte Prototyp dargestellt. Das U_L - Segment ist eingeschlossen von den invertierten repetitiven Sequenzen b und b', das U_S - Segment entsprechend von den Sequenzen c und c'. An den Enden des Virusgenoms und an der Verbindungsstelle zwischen den Segmenten U_L und U_S finden sich weitere Sequenzbereiche, die als "a- Sequenzen" bezeichnet werden. In diesen Sequenzabschnitten liegen die konservierten Erkennungsregionen für die Prozessierung und Verpackung der Virus- DNA (McVoy et al., 1998). Die Anzahl und Länge der a- Sequenzen sind variabel.

Das Genom des HCMV- Stammes AD169 ist vollständig sequenziert (Chee *et al.*, 1990). Die computergestützte Analyse weist 208 potentielle Leserahmen aus, die für Proteine mit mehr als 100 Aminosäuren (AS) codieren können. Von diesen zeigen etwa 40 Leserahmen signifikante Homologien zu Genen anderer Herpesviren. Diese Gene, deren Produkte grundlegende Virusfunktionen wie z.B. DNA- Replikation und

Verpackung sowie Kapsidstruktur und Zusammenbau der Virionen steuern, sind bei allen bekannten Herpesviren konserviert. Sie sind in sieben charakteristischen Genblöcken angeordnet, welche sich zwar in ihrer Position auf dem Genom und ihrer Orientierung zueinander unterscheiden können, aber bezüglich der Anordnung innerhalb des Genblocks nur wenig variieren (McGeoch *et al.*, 2000). Diese sieben "Module" stellen die genetische Grundausstattung aller bekannten Herpesviren dar; ihre Genprodukte sind für die Virusvermehrung absolut essentiell.

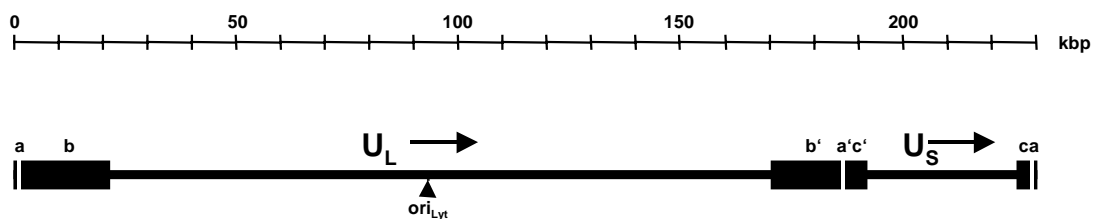


Abbildung 1: Aufbau des Prototyp- Genoms des Humanen Cytomegalievirus.

Die oberste Linie zeigt eine Größenskala mit der Einheit Kilobasenpaare (kbp). Ori_{Lyt} bezeichnet den Replikationsursprung. Dargestellt ist der Prototyp "P" des HCMV- Genoms. Die Pfeile bezeichnen die Orientierung der Segmente zueinander.

Die offizielle Namensgebung eines viralen Proteins basiert auf der fortlaufenden Nummerierung der potentiellen Leserahmen auf dem Prototyp des Genoms. So wird beispielsweise das Glykoprotein H auch als gpUL75 bezeichnet; gp weist es als Glykoprotein aus, U_L bezeichnet die Lokalisation des Gens auf dem U_L- Segment und die Ziffer (75) die Nummer des Leserahmens auf dem Segment.

3.3.2 Virionstruktur

Cytomegalieviren zeigen die typische Morphologie der Herpesviren (Abb. 2). Die elektronendichte innere Strukturkomponente (core) der 200 nm großen Virionen besteht aus einem DNA- Protein- Komplex und besitzt einen Durchmesser von ca. 75 nm. Sie wird von einem ikosaedrischen Kapsid umgeben, welches sich aus 162 Kapsomeren zusammensetzt und einen Durchmesser von 100 nm besitzt. Zwischen Nukleokapsid und Lipidhülle befindet sich das sogenannte Tegument, eine amorphe Proteinmatrix, die überwiegend aus Phosphoproteinen besteht. Der Hauptbestandteil, das Phosphoprotein pp65, kann bis zu 95 % der Proteinmasse des Teguments ausmachen (Gibson & Irmieri, 1984).

Die Virushülle besteht aus einer Lipiddoppelschicht von etwa 11 nm Dicke (Tooze *et al.*, 1993), in die sowohl zelluläre als auch virale Glykoproteine eingelagert sind. Sie vermitteln das Andocken der Viren an die Rezeptoren der Wirtszelle und die Fusion der Virushülle mit der Zellmembran und somit die Infektiosität des Virions. Durch ihre exponierte Position sind sie ein Hauptziel für neutralisierende Antikörper im infizierten Wirtsorganismus.

Die viralen Glykoproteine des HCMV sind in definierten Komplexen auf der Virusoberfläche organisiert (siehe 3.4).

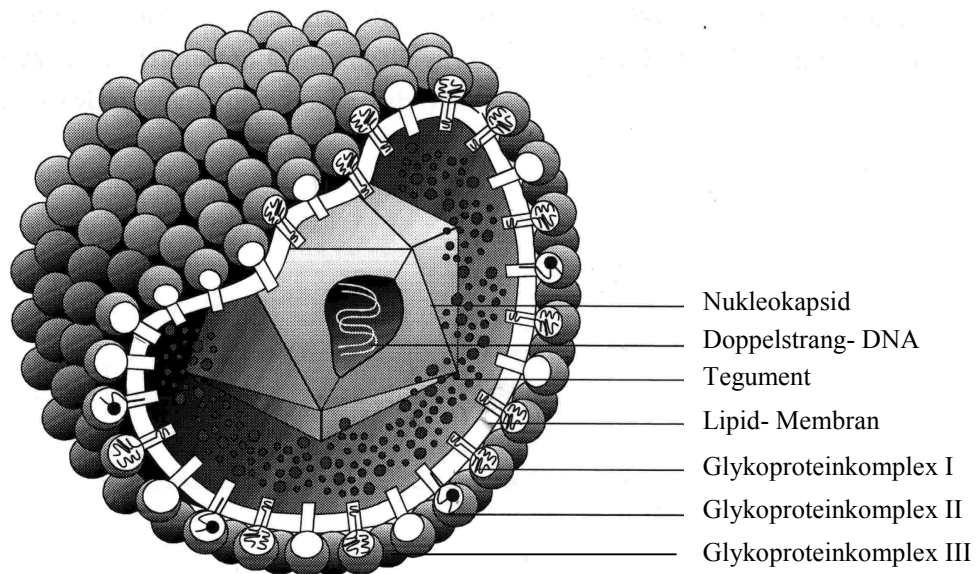


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Humanen Cytomegalievirus (©M. Reschke).

3.3.3 Viraler Infektionszyklus

Ein Infektionszyklus des HCMV in Zellkultur dauert von der Adsorption bis zur Freisetzung der Tochterviren etwa 72 Stunden.

Die initiale Bindung des Virions erfolgt an Heparansulfatproteoglykane der Zelloberfläche (Compton *et al.*, 1993). Für diese Bindung ist vermutlich der Glykoproteinkomplex II, möglicherweise auch der Glykoproteinkomplex I verantwortlich (Kari & Gehrz, 1992). Diese relativ unspezifische Interaktion ermöglicht den nächsten Schritt, die spezifische Bindung eines Virusliganden an

den/die zellulären Rezeptor(en). Als Wirtszellrezeptoren wurden einige Proteine diskutiert, z.B. ein Protein von 30-34 kDa (Adlish *et al.*, 1990; Taylor & Cooper, 1990) sowie ein Protein von 92,5 kDa (Keay & Baldwin, 1995), bislang ist aber noch kein zelluläres Protein eindeutig als Rezeptor identifiziert worden.

Nach dem Andocken der Viren fusionieren die Membranen von Virus und Wirtszelle in einem pH- unabhängigen Prozess (Compton *et al.*, 1992), wodurch die nackten Nukleokapside ins Zytoplasma gelangen. Die Kapside werden vermutlich analog zu Herpes Simplex- Virus 1 (HSV1) mit Hilfe des zellulären Motorproteins Dynein an den Mikrotubuli entlang zum Zellkern transportiert (Sodeik *et al.*, 1997). Nach Bindung der Kapside an die Kernpore wird die Virus- DNA ins Nukleoplasma abgegeben (Ojala *et al.*, 2000).

Im Zellkern wird die virale DNA zunächst zirkularisiert. Danach findet die kaskadenartig gestaffelte Transkription und Expression sowie die Replikation des Genoms statt.

Die Transkription im sehr frühen (*immediate early*-) Stadium (0 bis 3 Stunden nach Infektion) führt zur Synthese von regulatorischen Proteinen (α - Genprodukte) und ist unabhängig von der Synthese anderer viraler Proteine. Die Transkription dieser Gene wird überwiegend durch den *major immediate early Promotor* reguliert, einen der stärksten bekannten eukaryontischen Promotoren. Die Transaktivierung dieses Promotors erfolgt durch zellspezifische Faktoren.

Die regulatorischen α - Genprodukte leiten daraufhin die zweite Kaskade der Genexpression ein, die *early*- Phase (3 bis 24 Stunden nach Infektion). In dieser Phase werden die β - Genprodukte exprimiert, zu denen ebenfalls regulatorische Proteine gehören, aber auch virale Glykoproteine, z. B. gB oder gp48. Auch die Expression der viralen DNA- Polymerase als Voraussetzung für die Replikation der viralen DNA fällt in diese Phase.

Mit dem Einsetzen der Replikation der Virus- DNA (etwa 24 bis 36 Stunden nach Infektion), die nach dem *Rolling circle*- Mechanismus (McVoy & Adler, 1994) erfolgt, beginnt die *late*- Phase der Virusvermehrung. Während dieser Phase werden überwiegend Strukturproteine, d.h. Bestandteile der reifen Virionen synthetisiert. Die γ - Proteine der späten Phase werden in zwei Gruppen unterteilt: γ 1- Proteine (z.B. pp150, das Haupttegumentprotein und pp71, ein Transaktivator in der γ - Phase) können unabhängig von der Replikation viraler DNA exprimiert werden. Die Synthese von γ 2- Proteinen (z.B. gH, pp28; Meyer *et al.*, 1988) ist jedoch absolut

abhängig von der Replikation der Virus- DNA und der vorherigen Synthese anderer viraler Proteine.

Nach Zusammenbau der Kapside aus den einzelnen Strukturkomponenten wird die konkatemere virale DNA unter Beteiligung des Proteins p130 (pUL56) an den a-Sequenzen auf Genomgröße zurechtgeschnitten und verpackt (Bogner *et al.*, 1998).

3.3.4 Morphogenese des Humanen Cytomegalievirus

Die virale Morphogenese beginnt mit dem Zusammenbau der Kapside im Zellkern. Bei elektronenmikroskopischen Aufnahmen infizierter Zellen können drei verschiedene Kapsidformen unterschieden werden, die A-, B- und C- Kapside. Die B- Kapside enthalten noch keine DNA und stellen unreife Vorläufer der A- und C- Kapside dar. Wird die DNA korrekt in die Kapside verpackt, kommt es zur Bildung von reifen C- Kapsiden, durch Fehler bei der DNA- Verpackung entstehen die DNA-freien A- Kapside.

Die Kapside verlassen den Kern und gelangen ins Cytoplasma durch einen Vorgang, der als *Transportknospung* bezeichnet wird (Radsak *et al.*, 1989). Diesem Schritt geht zunächst eine Auflockerung der mit der inneren Kernmembran assoziierten Kernlamina- Proteine voraus, die durch Änderung des Phosphorylierungsstatus dieser Proteine bewirkt wird (Radsak *et al.*, 1991). Die Kapside gelangen durch diesen Knospungsprozess an der inneren Kernmembran in die perinukleäre Zisterne, wobei sie eine temporäre, von der inneren Kernmembran abgeleitete Lipidhülle erhalten (Abb. 3). Diese Hülle fusioniert anschließend mit der äußeren Kernmembran und setzt die nackten Nukleokapside ins Cytoplasma frei. Die endgültige Umhüllung der Kapside findet an Membranen des Trans- Golgi- Netzwerkes (TGN) oder des frühen Endosoms statt (Tooze *et al.*, 1993). Diese beiden Zellkompartimente sind in infizierten Zellen nicht mehr deutlich voneinander zu trennen (Sodeik *et al.*, 1993). Die zweite Knospung, die sogenannte *Reifungsknospung*, führt zu Kapsiden mit einer doppelten Lipidhülle. Die äußere dieser Hüllen fusioniert von der Innenseite mit der Plasmamembran, so dass reife, einfach umhüllte Virionen aus der Zelle freigesetzt werden (Abb. 3).

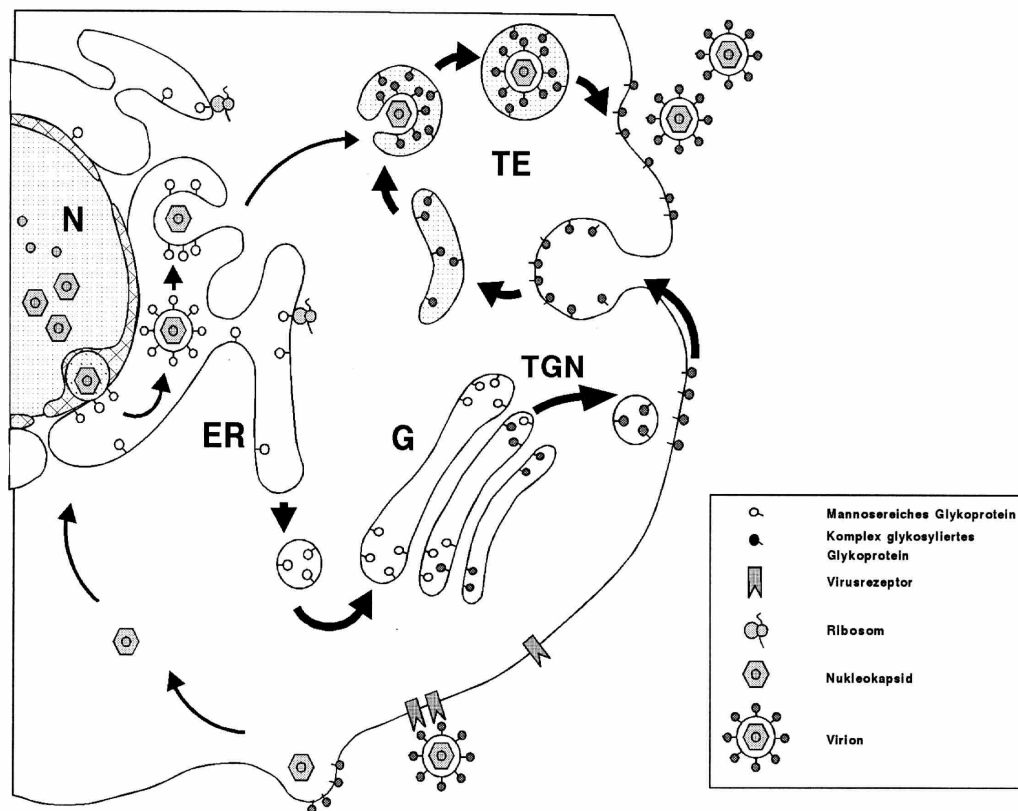


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Morphogenese des Humanen Cytomegalievirus und des intrazellulären Transportweges der Glykoproteine.

Die schmalen Pfeile bezeichnen den Transport von Parental- und Tochterviren, die stärkeren Pfeile die intrazelluläre Transportroute der Glykoproteine (Eickmann et al., 1998).

Abkürzungen: ER = Endoplasmatisches Retikulum, TE = tubuläres Endosom, G = Golgi, N = Zellkern, TGN = Trans- Golgi Netzwerk.

3.4 Glykoproteine der Virushülle

Im Vergleich zu anderen Herpesviren weist das HCMV eine geringere Anzahl von Hüllmembranglykoproteinen auf (Tab. 2). Die Glykoproteine der Virushülle sind die Determinanten der Infektiosität, d. h. die Liganden für den initialen Kontakt des Virus mit der Wirtszelle; sie vermitteln die Adsorption und die Penetration des Virus. Darüber hinaus sind sie offenbar auch an der horizontalen Zell- Zell- Ausbreitung des Virions innerhalb eines infizierten Zellverbandes beteiligt (Peeters et al., 1992).

Im Falle des HCMV sind drei Glykoproteinkomplexe definiert worden. Der Glykoproteinkomplex I (gcI) besteht aus Homodimeren des Glykoproteins B (gpUL55), wobei die Komplexierung auf intermolekularen Disulfidbrücken beruht (Eickmann *et al.*, 1998). Der Glykoproteinkomplex II (gcII) besteht aus den

Glykoproteinen M (gpUL100) und N (gpUL73), die ebenfalls über Disulfidbrücken, aber auch über nichtkovalente Bindungen miteinander verknüpft sind (Kari & Gehrz, 1993, Mach *et al.*, 2000). Der Glykoproteinkomplex III (gcIII) besteht aus den Glykoproteinen H, L und O (gpUL75, gpUL115 und gpUL74; Cranage *et al.*, 1988; Huber & Compton, 1998; Huber & Compton, 1999; Kaye *et al.*, 1992).

Der gC entsteht in der β - und γ - Phase der Infektion (Spaete *et al.*, 1988) im endoplasmatischen Retikulum durch die Formierung zweier gB-Moleküle zum Homodimer. Nach verschiedenen Modifikationen werden die Moleküle innerhalb des Komplexes durch Furin gespalten; die Untereinheiten bleiben über intramolekulare Disulfidbrücken verbunden (Britt & Vugler, 1992; Farrer & Greenaway, 1986). Der reife Komplex wird schließlich in den Trans- Golgi- Vesikeln zur Plasmamembran und nach Reinternalisierung zum Kompartiment der viralen Umhüllung transportiert (Eickmann *et al.*, 1998; Jarvis *et al.*, 2002).

Tabelle 2: Homologe Glykoproteine einiger Herpesviren
 Abkürzungen: HSV Herpes- Simplex Virus; VZV Varizella- Zoster Virus; EBV Epstein- Barr Virus; PRV Pseudorabies Virus; HCMV Humanes Cytomegalievirus.

HSV	VZV	EBV	PRV	HCMV
gB	gpII	gp125	gII	gB (gp UL55)
gC	gpV		gIII	
gD			gp50	
gE	gpI		gI	
gG			gX	
gH	gpIII	gp85	gH	gH (gp UL 75)
gI	gpIV		gp63	
gK				
gL	gpVI	gp25	gL	gL (gp UL115)
gM				gM (gp UL100)
gN				gN (gp UL73)
		gp		gO (gp UL74)
		42/38?		
		gp		
		220/350		

gB selbst ist für die Virusvermehrung essentiell (Hobom et al., 2000; Strive, Doktorarbeit, 2001). Ihm werden wichtige Funktionen bei Fusionsprozessen innerhalb des viralen Infektionszyklus zugeschrieben.

Die genaue Funktion des gCII ist nicht bekannt, jedoch lässt sich aus der Tatsache, dass der Komplex Heparin bindet, eine Funktion beim Virusattachement vermuten (Kari & Gehrz, 1992). 62 % der HCMV-positiven Patientenserum reagieren mit dem HCMV-gCII-Komplex, aber nicht mit den einzelnen Proteinen (Mach et al., 2000). gM ist für HCMV essentiell (Hobom et al., 2000), nicht jedoch für bestimmte α - und γ -Herpesviren (Baines & Roizman, 1991; Dijkstra et al., 1996; Osterrieder et al., 1997). Monoklonale Antikörper gegen gN neutralisieren das Virus (Mach et al., 2000).

Der gCIII besteht aus gH, gL und gO. Komplexe aus drei Glykoproteinen sind bis jetzt nur bei dem γ -Herpesvirus EBV bekannt, wo der homologe Komplex aus gH, gL und gp42/38 besteht (Li et al., 1995). Die Entstehung des gCIII-Komplexes erfolgt durch die Verbindung von gH und gL über Disulfidbrücken, danach wird mit zeitlichem Verzug gO wahrscheinlich noch im endoplasmatischen Retikulum (ER) an diesen Komplex angelagert (Huber & Compton, 1999). Eine für β -Herpesviren spezifische Domäne im N-terminalen Bereich des gH ist vermutlich für die Bindung an gL verantwortlich (Anderson & Gompels, 1999). Weitere Modifikationen finden in post ER-Kompartimenten statt, bevor der Komplex an die Plasmamembran transportiert wird. Diesem Komplex wird eine besondere Bedeutung bei der Fusion der Virushülle mit der Plasmamembran der Wirtszelle zugeschrieben (Milne et al., 1998).

Die Funktionen der einzelnen Proteine des Komplexes sind bisher nur zum Teil definiert.

Dem Protein gL wird eine Chaperon-ähnliche Funktion bei der Prozessierung und dem zielgerichteten Transport von gH zugeschrieben.

Für gO wurde berichtet, dass es in infizierten Zellen den gH/gL-Komplex an die Zelloberfläche dirigiert. Dieser Transport erfolgt jedoch in Zellen, die mit gH und gL kotransfiziert sind, auch ohne Beteiligung von gO (Kaye et al., 1992; Milne et al., 1998; Spaete et al., 1993). gO ist für die Virusvermehrung nicht essentiell.

Zur Funktion des gH siehe 3.5.3.

3.5 Das Glykoprotein H des Humanen Cytomegalievirus

3.5.1 Struktur des Glykoproteins H

Das Protein wird durch den offenen Leserahmen UL75 im L-Fragment des *Hind III*-kartierten Genoms des HCMV- Stammes AD169 codiert. Das Gen beginnt mit dem 110132. Basenpaar (bp) und endet nach 2229 Nukleotiden mit dem 107903. bp des HCMV- Genoms (Chee et al., 1990). Die Sequenzähnlichkeiten der gH- Homologen verschiedener Unterfamilien sind auf drei Regionen des Moleküls beschränkt. Bezogen auf das HCMV- Genom handelt es sich dabei um die Bereiche der AS 1-104, 488- 566 und 571- 743 (Gompels et al., 1988), während die übrigen Bereiche weniger Übereinstimmungen zeigen. Interessanterweise haben auch die gH- Proteine der Laborstämme AD169 und Towne eine für das Cytomegalievirus ungewöhnliche, stammspezifische Variabilität in einem aminoterminalen Epitop mit einer 46 %igen Sequenzabweichung innerhalb der ersten 37 Aminosäuren (Pachl et al., 1989). In diesem Abschnitt fehlt außerdem ein Kodon beim gH des Stammes Towne, so dass das Protein aus nur 742 Aminosäuren besteht.

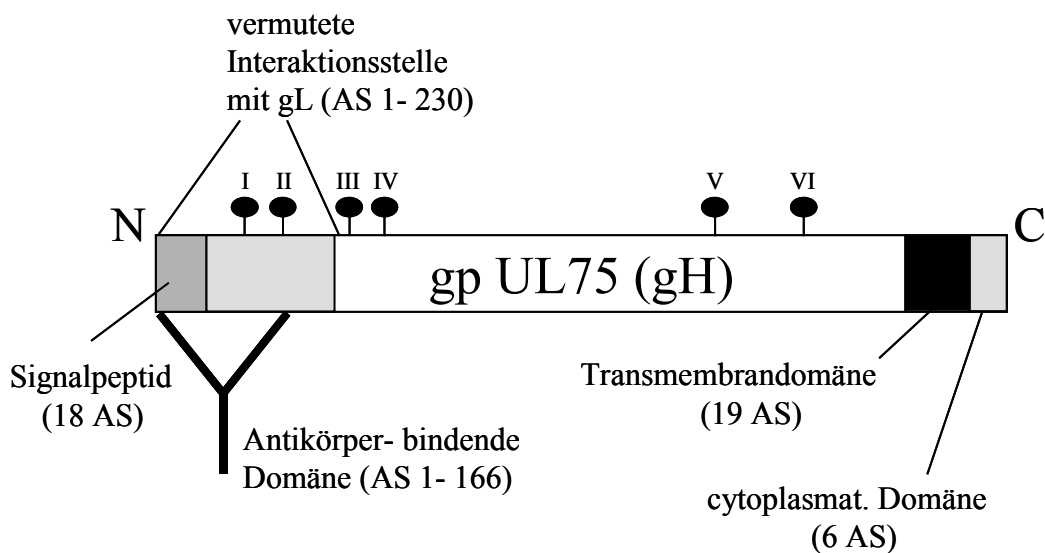


Abbildung 4: Schema der gH- Struktur.

Dargestellt sind N- terminal das Signalpeptid, die vermutete Interaktionsstelle für gL und die Antikörperbindungsstelle. C- terminal befindet sich die Transmembrandomäne und die cytoplasmatische Domäne. Mit I-VI bezeichnet sind die Glykosylierungsstellen.

Bei dem 743 Aminosäuren (AS) langen Protein des Stammes AD169 handelt es sich um ein Typ I- Membranglykoprotein. N- terminal verfügt es über ein aus 18 hydrophoben AS bestehendes Signalpeptid (Abb. 4). Carboxyterminal gelegen befindet sich eine hydrophobe Transmembrandomäne von 19 AS Länge (Cranage et al., 1988) und eine sehr kurze cytoplasmatische Domäne von nur 6 AS Länge. Ausserdem enthält es 6 konservierte Cysteinreste, von denen 4 auch in den gH-Homologen von EBV, VZV, und HSV 1 zu finden sind (Cranage et al., 1988). Von den 6 abgeleiteten N- Glykosylierungsstellen ist eine bei allen verglichenen Homologen positionell konserviert (Klupp & Mettenleiter, 1991).

3.5.2 Reifung und Transport des Glykoproteins H

Die Biosynthese des Glykoproteins H beginnt während der γ - Phase des Infektionszyklus etwa 48 Stunden nach Infektion durch Translation eines 2,9 Kilobasen (kb) langen Transkriptes an den Ribosomen des rauhen Endoplasmatischen Retikulums (rER, Pachl et al., 1989). Das Protein wird kotranslational zu einer mannosereichen Vorstufe von 86 kDa glykosyliert, wobei nur vier der sechs potentiellen N-Glykosylierungsstellen besetzt werden (Bogner et al., 1992). Innerhalb etwa einer Stunde nach Synthese erfolgt die Oligomerisierung mit den Glykoproteinen L und O zu einem hochmolekularen Komplex (gcIII, Huber & Compton, 1998). Durch Anheftung komplexer Kohlenhydratseitenketten entsteht beim Transport entlang des zellulären Exozytoseweges via Golgi- Apparat eine gH-Form von 89 kDa. Intrazellulär sind somit zwei unterschiedlich modifizierte gH-Formen nachweisbar, die als mannosereiche Vorstufe und als reifes virusassoziiertes Protein charakterisiert werden können (Bogner et al., 1992).

3.5.3 Funktionen des Glykoproteins H

Das Glykoprotein H induziert im infizierten Organismus die Bildung neutralisierender Antikörper gegen lineare und konformationsabhängige Epitope (Reschke, Diplomarbeit, 1990; Bogner et al., 1992; Urban et al., 1992; Simpson et al., 1993). Daraus lässt sich ableiten, dass gH eine wichtige Rolle für die Infektiosität

des Virus spielt. Es reagieren etwa 73 % der Seren HCMV- positiver Patienten mit gH (Eggers et al., 2001).

Über die genaue Funktion des gH des HCMV ist bisher wenig bekannt. Auch über die Funktionen des gH anderer Herpesviren gibt es keine genauen Vorstellungen.

Dem C-Terminus von HHV 6- gH wird eine wichtige Funktion bei der Fusion und bei der Zell- Zell- Ausbreitung zugeschrieben (Anderson & Gompels, 1999).

Die Lokalisation des Proteins in der inneren und äußeren Kernmembran, den Membranen des rER, des Golgi- Apparates sowie des TE lässt auf eine Rolle bei der Transport- und Reifungsknospung und somit bei der Morphogenese des Virus schließen (Huber & Compton, 1997; Forrester et al., 1992; Fuller et al., 1992; Peeters et al., 1992). Es ist jedoch nicht bekannt, ob umhüllte Virionen ohne die Beteiligung von gH entstehen können. Neben komplexiertem gH kommt in der viralen Hülle auch freies gH vor (Li et al., 1997), interessanterweise nicht jedoch auf der Zelloberfläche (Huber & Compton, 1999).

3.6 Mutanten des Humanen Cytomegalievirus

3.6.1 Herstellung von Virusmutanten durch Insertionsmutagenese

Eine gängige experimentelle Strategie, die Funktion eines viralen Genproduktes aufzuklären, besteht darin, das entsprechende Gen zu entfernen oder gezielt zu mutagenisieren und den resultierenden Phänotyp der Virusmutante zu charakterisieren.

Bei Viren mit kleinen Genomen, wie z.B. dem Adenovirus (Berkner & Sharp, 1983, Ghosh-Choudhury *et al.*, 1986) oder dem Ebolavirus (Volchkov *et al.*, 2001) ist es möglich, das Gesamtgenom in Form von cDNA in ein einziges Plasmid zu inserieren und darin durch molekularbiologische Standardverfahren gezielt zu mutagenisieren.

Bei HCMV mit einer Genomgröße von etwa 230 kb ist der klassische Weg der Mutantenherstellung hingegen die gezielte Insertionsmutagenese. Bei dieser Methode wird ein Selektionsmarker- Gen auf einem Plasmid zu beiden Seiten mit flankierenden virusspezifischen Sequenzen versehen. Diese flankierenden Regionen sind identisch mit den DNA- Abschnitten, die das zu deletierende Gen auf der viralen DNA eingrenzen. Dieses Plasmid wird zusammen mit viraler DNA entweder durch Cotransfektion mit gereinigter Virus- DNA oder durch Transfektion und

anschließende Überinfektion in die Wirtszelle eingebracht. Durch homologe Rekombination über die flankierenden Bereiche kann das zu untersuchende Gen durch den Selektionsmarker ersetzt werden (Strive, 1997). Auf diese Weise sind einige Mutanten des HCMV hergestellt worden (Jones & Muzithras, 1992; Jones *et al.*, 1991; Patterson & Shenk, 1999; Spaete & Mocarski, 1987). Der Nachteil dieser Methode ist die Notwendigkeit der Trennung der Mutante vom Wildtypvirus. Daher muss eine aufwendige Plaquereinigung angeschlossen werden, um die Mutante vom Wildtypvirus zu reinigen, wobei häufig das zusätzliche Problem eines Wachstumsnachteils der Mutante überwunden werden muss. Mit dieser Methode können grundsätzlich nur Virusmutanten hergestellt werden, deren Defekt mit der Virusvermehrung vereinbar ist.

Eine weitere Methode ist die Nutzung einer Cosmidbank, in der das gesamte HCMV-Genom in Form überlappender Cosmide vorliegt (Fleckenstein *et al.*, 1982). Durch ihre im Vergleich zum HCMV-Genom geringere Größe sind diese Cosmide leichter im bakteriellen System zu mutagenisieren. Nach Kotransfektion dieser Cosmide ist es möglich, infektiöse virale Nachkommen zu generieren (Kemble *et al.*, 1996). Dieser Ansatz erwies sich jedoch als ungeeignet für die Deletion essentieller Gene. (A. Ottemeyer, Diplomarbeit, 1996).

3.6.2 Bacterial Artificial Chromosomes (BACs)

Einen entscheidenden Fortschritt im Hinblick auf die Mutantenherstellung bei Herpesviren erzielten 1997 M. Messerle und Mitarbeiter (Messerle *et al.*, 1997), indem es ihnen gelang, das gesamte Genom des murinen Cytomegalievirus (MCMV) als zirkuläres künstliches Chromosom (*Bacterial Artificial Chromosome*, BAC) in Bakterien zu propagieren. BACs sind Derivate von F-Plasmiden (*fertility-Plasmide*), die in *E. coli* die Konjugation steuern und werden unter anderem als Vektoren zur Herstellung von großen eukaryontischen Genbanken verwendet (Shizuya *et al.*, 1992). Grosse Fremd-DNA Stücke bleiben in den BACs lange Zeit stabil, da sie als Plasmide in Bakterien, welche ihre Fähigkeit zur Rekombination verloren haben (Borst *et al.*, 1999; Shizuya *et al.*, 1992), vermehrt werden können.

Um die virale DNA in die F-Plasmide einzubringen, wurde zunächst ein Schritt der klassischen Insertionsmutagenese vorgeschaltet. Der für die Replikation in Bakterien

notwendige F- Anteil des Plasmids wurde mit flankierenden DNA- Abschnitten versehen, die homolog zu einem Bereich der viralen DNA waren. Die Integration des F- Plasmid- Anteils durch homologe Rekombination in das Virusgenom erfolgte nach Kotransfektion des Plasmides mit gereinigter zirkulärer Virus- DNA in eukaryontische Zellen.

Die in reifen Herpesviren lineare doppelsträngige Virus- DNA wird nach dem *rolling- circle-* Mechanismus repliziert (Pfuller & Hammerschmidt, 1996) und muss daher zur Replikation in den eukaryontischen Zellen zirkularisiert werden. Diese Zirkularisierung ermöglichte die Extraktion von ringförmig geschlossener Virus- DNA mit F- Plasmidanteilen (Hirt, 1967), die nach Transformation in *E. coli* repliziert werden konnte.

Auf diese Weise sind inzwischen zahlreiche BACs mit den Genomen verschiedener Herpesviren hergestellt worden (Adler *et al.*, 2000; Delecluse *et al.*, 1998; Messerle *et al.*, 1997; Saeki *et al.*, 1998; Schumacher *et al.*, 2000; Smith & Enquist, 1999), unter anderem auch ein HCMV- BAC (Borst *et al.*, 1999). Durch die gut etablierten Mutagenesemethoden in Bakterien (Borst *et al.*, 2001; Messerle *et al.*, 1997; Muyrers *et al.*, 1999) kann im BAC- System eine beliebige Mutation in das herpesvirale Genom eingebracht werden.

Die mutagenisierten Virus- BACs können in ausreichender Menge aus den Bakterien präpariert und in eukaryontische Zellen transfiziert werden. Durch die klonale Selektion in Bakterien entfällt die Kontamination mit Wildtypvirus- DNA, weshalb sogar eine Anzüchtung von stark attenuierten Virusmutanten möglich ist.

Virusmutanten, deren Mutation zu einem letalen Phänotyp führt, können jedoch nur gewonnen werden, wenn ihr Defekt durch Komplementation des fehlenden Genproduktes *in trans* in einem entsprechenden Wirtszellsystem kompensiert wird. Auch weiterführende Untersuchungen zur Eingrenzung funktioneller Domänen essentieller Genprodukte können auf diesem Weg durchgeführt werden.

3.6.3 Komplementierende Zellsysteme

Bei der Bereitstellung komplementierender Zellsysteme müssen im Falle des HCMV im Vergleich zu anderen Herpesviren zusätzliche Schwierigkeiten überwunden werden. Eine Komplementation wird durch Zellklone erreicht, welche das Gen für

das zu komplementierende Protein stabil ins eigene Genom integriert haben. Bei der Selektion stabil transfizierter Zellsysteme müssen mehrere Zellteilungen durchlaufen werden, so dass nur Zelllinien mit unbegrenzter Wachstumsfähigkeit hierfür verwendet werden können.

Im Gegensatz zu Herpesviren anderer Subfamilien zeigt das Humane Cytomegalievirus (HCMV) *in vitro* eine strikte Zelltypspezifität. Eine effiziente Vermehrung des Virus gelingt nur in primären humanen Fibroblasten, die jedoch nach einer begrenzten Anzahl von Passagen altern und sich daher nicht zur Herstellung stabil transfizierter Zellklone eignen. Es wurde im HCMV- System bisher die Komplementation mittels Adenhelferviren, Retrohelferviren (diese Arbeit) und stabil transformierter humaner Astrozytomzellen, wobei es sich um immortalisierte Derivate eines Neuroglia- Tumors handelt, getestet. Weiterhin wurde eine permanente Fibroblastenzelllinie, in welcher der Alterungsprozess durch Überexpression des Enzyms Telomerase verzögert ist (Bodnar *et al.*, 1998, Bresnahan *et al.*, 2000), auf Eignung geprüft. Bisher waren diese Ansätze nur begrenzt erfolgreich.

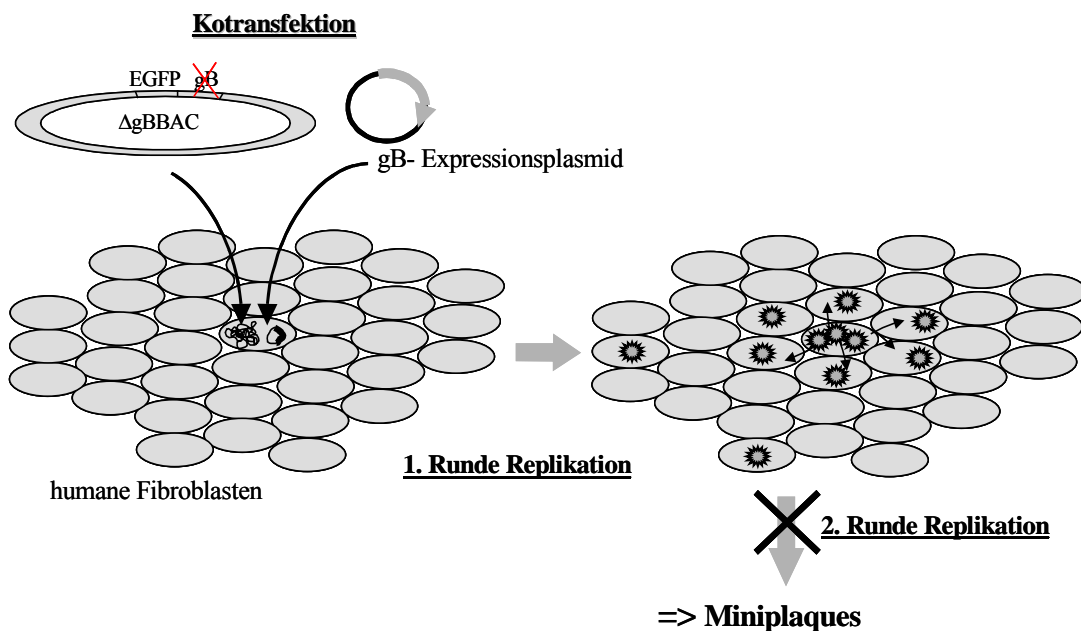


Abbildung 5: Schematische Darstellung des „Ein- Zyklus- Replikations- Komplementations- Assays“. Kotransfektion von humanen Fibroblasten mit HCMV- BAC Δ gBgf β und einem gB- Expressionskonstrukt (linke Bildhälfte). In kotransfizierten Zellen findet eine Runde der Replikation statt, was durch abortive Infektion umliegender Zellen zur Ausbildung von grün fluoreszierenden Miniplaques führt (rechte Bildhälfte).

Eine weitere Methode ist die Kotransfektion des replikationsdefizienten mutagenisierten BAC mit einem geeigneten Expressionsplasmid. Bei dieser Strategie erfolgt im Gegensatz zu den oben genannten Ansätzen, die zu einer stabilen Expression führen, eine transiente Expression des gewünschten Proteins. Aus einer so kotransfizierten permissiven Zelle können infektiöse virale Partikel freigesetzt werden, da durch transiente Expression des fehlenden Proteins eine komplette Replikationsrunde des Virus ermöglicht wird (Abb. 5). Die freigesetzten Partikel sind ihrerseits in der Lage, vor allem benachbarte Zellen abortiv zu infizieren. Durch die Insertion des Gens für das EGFP- Markerprotein in das virale BAC- Genom ist ein solches Ereignis durch die Ausbildung grün fluoreszierender Miniplaques nachweisbar. Diese Strategie wurde bereits erfolgreich zur phänotypischen Komplementation eines HCMV- Δ gB- BACs verwendet und als „Ein- Zyklus- Komplementations- Assay“ bezeichnet (T. Strive, Doktorarbeit, 2001).

4. Zielsetzung der Arbeit

Das Glykoprotein H (gH) ist in der Familie der Herpesviren eine prominente und konservierte Komponente der Virushülle. Im HCMV- System ist seine Funktion im Replikationszyklus des Virus weitgehend ungeklärt. Vor allem liegen keine Kenntnisse über die genaue funktionelle Struktur des Proteins vor.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst die essentielle Funktion des HCMV- gH für die Virusvermehrung bestätigt werden. Dazu sollte das gH- Gen mithilfe des BAC- Systems direkt im HCMV- Genom funktionell deletiert und die Infektiosität durch phänotypische Komplementation *in trans* rekonstituiert werden. Im Anschluss sollten mit dieser Strategie Abschnitte des gH- Proteins, die essentiell für die Vermehrung des Virus sind, identifiziert werden.

Neben stabilen Expressionssystemen sollte für die Komplementation des erhaltenen HCMV- BAC Δ gHgfp vor allem die Kotransfektion mit Expressionsplasmiden zur transienten Expression entsprechend mutagenisierter gH- Proteine zur Anwendung kommen.

5. Material

5.1 Geräte

ABI PRISM 377 DNA Sequencer	Applied Biosystems, Weiterstadt
Biofuge 13	Heraeus Sepatech, Hanau
Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Digitale Kameraausrüstung Spot	Diagnostic Instruments, Michigan, USA
Fluoreszenz-Mikroskop Axioplan	Zeiss, Oberkochen
GeneAmp PCR System 2400	Applied Biosystems, Weiterstadt
GenePulser II	BioRad, München
Labovert Mikroskop	Leitz, Wetzlar
Minifuge T	Heraeus, Hanau
Minigelkammer, horizontal	BioRad, München
Photomikroskop Axiophot	Zeiss, Oberkochen
Photometer GeneQuant II RNA/DNA Calculator	Pharmacia, Freiburg
Photospektrometer DU40	Beckmann, Glennrothes
Quarzküvette, 10 mm	Hellma, Mühlheim
Ultraschallgerät Sonifier [®] B15	Branson, Danbury, USA
Ultrazentrifuge L7-55/L8-55M	Beckmann, Frankfurt
Ultrazentrifuge TL-100	Beckmann, Frankfurt
Zentrifuge J2-21	Beckmann, Frankfurt
Zentrifuge Rotina 48R	Hettich, Tuttlingen

5.2 Verbrauchsmaterialien

Elektroporationsküvetten	BioRad, München
Küvetten	BioRad, München
Nitrozellulose- Membran, 0,2 µm	Schleicher & Schuell, Dassel
Parafilm	American Can Company,

Reaktionsgefäße	Greenwich, USA Eppendorf, Hamburg; Corning Inc., Corning, Canada; Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Spritzen/ Kanülen	Greiner, Nürtingen
Sterilfilter	Braun, Melsungen
Zellkulturflaschen und -schalen	Schleicher & Schuell, Dassel; Greiner, Nürtingen
Zentrifugenröhrchen	Costar, Cambridge, USA Beckmann, München

5.3 Chemikalien und Biochemikalien

Aceton	J. T. Baker/Holland
Acrylamidlösung Gel 30	Roth, Karlsruhe
Affi- Gel 10 (bindet saure Proteine)	BioRad, München
Affi- Gel 15 (bindet basische Proteine)	BioRad, München
Agarose	Life Technologies, Karlsruhe
Aprotinin (Trasylo [®])	Bayer, Leverkusen
2-Amino-2-(hydromethyl)-propan-1,3-diol (Tris)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	LKB, Bromma/Schweden
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	Roche, Mannheim
Calciumchlorid Dihydrat	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
4-Chloro-1-naphthol	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt

Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roche, Mannheim
Glucose	Sigma, Deisenhofen
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Iodixanol (Optiprep™)	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat- Heptahydrat	Roth, Karlsruhe
Methanol	Riedel-de-Haen, Seelze
2-Mercaptoethanol	Merck-Schuchard, Hohenbrunn
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
N-[2-Ethansulfonsäure] (HEPES)	Sigma, Deisenhofen
Nukleotide (dNTP)	Perkin Elmer, Norwalk, USA
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Amersham, Braunschweig
Rainbow™ protein molecular weight marker	Serva, Heidelberg
Rinderserumalbumin (BSA), Fraktion	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth, Karlsruhe

Alle nicht näher bezeichneten Chemikalien stammen von den Firmen:

BioRad	München
Roche Molecular Biochemicals	Mannheim
Merck	Darmstadt
Life Technologies	Karlsruhe
Riedel-de-Haen	Seelze

Roth	Karlsruhe
Serva	Heidelberg
Sigma	Deisenhofen

5.4 Detergentien

Natriumdesoxycholat (DOC)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Tween 20	Merck, Darmstadt

5.5 Enzyme

Alkalische Phosphatase (calf intestine alkaline phosphatase)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
AmpliTaq [®] DNA- Polymerase	Perkin Elmer, Norwalk, USA
Klenow Fragment	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Beverly, USA
Ribonuklease A (RNase A)	Serva, Heidelberg
<i>Pfu</i> - Turbo- DNA- Polymerase	Stratagene, La Jolla, USA
T4- DNA- Ligase	MBI Fermentas, St. Leon- Rot
Trypsin/EDTA	Life Technologies, Karlsruhe

5.6 Antibiotika

Ampicillin	Merck, Darmstadt
Penicillin	Life Technologies, Karlsruhe
Streptomycin	Life Technologies, Karlsruhe

Kanamycin	Serva, Heidelberg
Chloramphenicol	Serva, Heidelberg
Refobacin	Merck, Darmstadt
G 418	Clontech, Heidelberg

5.7 Kits

Lipofectin Transfection Reagent	Life Technologies, Karlsruhe
ABI PRISM BigDye Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt
Centri-Sep Columns	Princeton Separations, Adelphia, USA
Exo Mung Bean Deletion Kit	Stratagene, La Jolla, USA
MBS Mammalian Transfection Kit	Stratagene, La Jolla, USA
Nucleobond PC500 Kit	Macherey Nagel, Düren
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAPrep Spin Plasmid Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAamp Mini Kit	Qiagen, Hilden
Quick Change™ Site Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla, USA
RetroX ^R System	Clontech, Heidelberg
SuperSignal [®] West Dura Extended Duration Substrate	Pierce, Rockford, USA

5.8 Kulturmediengrundstoffe

Bacto- Agar	Difco, Detroit
Bacto- Hefe- Extrakt	Difco, Detroit
Bacto- Trypton	Difco, Detroit

Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)	Life Technologies, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FCS)	BioWhittaker, Verviers, Belgien
L- Glutamin	Life Technologies, Karlsruhe
Opti- Mem [®] I	Life Technologies, Karlsruhe
Trypsin/EDTA- Lösung	Life Technologies, Karlsruhe

5.9 Antikörper

Erstantikörper:

Polyklonales, polyspezifisches humanes Anti-HCMV-Serum (pabgH)	E. Reis, Inst. für Virologie, Marburg
Anti-HCMV-IE-IgG von der Maus	DuPont, Dreieich
Anti-HCMV-gBc von der Maus, mab58-15	W. Britt, Universität von Alabama, Birmingham, USA

Zweitantikörper:

Alexa Fluor [™] 488 Anti-Maus-IgG, von der Ziege	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Anti-Human- IgG von der Ziege, F(ab')- Fragmente, FITC- gekoppelt	Dianova, Hamburg
Anti-Human- IgG vom Kaninchen, Peroxidase- gekoppelt	DAKO, Hamburg
Alexa Fluor [™] 594 F(ab')- Anti-Maus-IgG vom Kaninchen	Molecular Probes, Leiden, Niederlande

Alexa Fluor™ 594 F(ab')- Anti-Human-IgG vom Kaninchen	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
B6-6 anti E2A- Antikörper	J. Flint, Princeton

5.10 Medien zur Anzuchtung von Bakterien

LB- Medium

Bacto- Trypton	0,5 % (w/v)
Bacto- Hefe- Extrakt	1,0 % (w/v)
NaCl	1,0 % (w/v)
MgSO ₄ (x7 H ₂ O)	0,25 % (w/v)

a. bidest

LB- Agar

Bacto- Trypton	0,5 % (w/v)
Bacto- Hefe- Extrakt	1,0 % (w/v)
NaCl	1,0 % (w/v)
MgSO ₄ (x7 H ₂ O)	0,25 % (w/v)
Bacto- Agar	1,5 % (w/v)

a. bidest

SOC- Medium (pH 7,0)

Bacto- Trypton	3,0 % (w/v)
Bacto- Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	10 mM
KCl	3 mM
MgCl ₂	20 mM
MgSO ₄	20 mM
Glucose	20 mM

a. bidest

Das SOC- Medium wurde sterilfiltriert.

TB- Medium

Bacto- Trypton	1,2 % (w/v)
Bacto- Hefe- Extrakt	2,4 % (w/v)
Glycerin	0,4 % (v/v)
KH ₂ PO ₄	17 mM
K ₂ HPO ₄	72 mM

Die Komponenten des Phosphatpuffers wurden separat autoklaviert und später zugegeben.

5.11 Puffer*PBS- Puffer (pH 7,4)*

di-Natriumhydrogenphosphat	19,0 mM
Kaliumhydrogenphosphat	2,2 mM
Natriumchlorid	0,2 mM

a. bidest

TBE-Puffer (10x)

Tris	900 mM
Borsäure	900 mM
EDTA	10 mM

a. bidest

TAE- Puffer (50x)

Tris	2000 mM
EDTA	50 mM
Eisessig	5,71 % (v/v)

a. bidest

5.12 Zellen

5.12.1 Primäre humane Lungenfibroblasten (MRC5)

Die primären humanen Lungenfibroblasten MRC5 (CCL-171, American Type Culture Collection (ATCC)) wurden von der Firma BioWhittaker, Verviers, Belgien, bezogen und zwischen der 18. und 26. Passage verwendet.

5.12.2 COS7- Zellen

COS7- Zellen wurden aus CV1- Zellen (Nierenepithelkarzinom- Zellen der afrikanischen grünen Meerkatze) durch Transformation mit dem SV40- T- Antigen gewonnen. Sie wurden von der American Type Culture Collection bezogen.

5.12.3 HEK293- Zellen

HEK293- Zellen wurden in vitro aus humanen Nierenzellen durch Adenovirus- E1- Transformation hergestellt (Graham et al., 1977).

5.12.4 911E4- Zellen

Diese Zellen wurden von He et al., 1998 beschrieben.

5.12.5 Retrovirus- Verpackungszelllinie pt67

Diese Verpackungszelllinie enthält die retroviralen Gene gag, pol und env und wurde von Clontech, Heidelberg, bezogen.

5.13 Virusstämme

Es wurde der HCMV- Laborstamm AD169 verwendet (Gupta et al., 1977).

5.14 Bakterienstämme

Tabelle 3: Bakterienstämme

Stamm	Kurzbeschreibung	Referenz
<i>E. coli</i> XL1blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac⁻</i> F ['] [<i>proAB⁺ lacI^d lacZΔM15 Tn10(tet^r)</i>]	(Bullock <i>et al.</i> , 1987)
<i>E. coli</i> DH10B	F ['] <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80dlacZΔM15</i> <i>ΔlacX74 endA1 recA1 deoR Δ(ara, leu) 7697 araD139</i> <i>galU galK nupG rpsL λ-</i>	(Lorow & Jessee, 1990)
<i>Epicurian Coli</i> JM109	E14-(<i>mcrA-</i>) <i>recA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(r_k-m_{k+})</i> [F ['] <i>traD36 proAB lacI^qZΔM15</i>]	(Yanisch – Perron <i>et al.</i> , 1985)
<i>E. coli</i> JC8679	F ['] <i>supE44 lacY1 galK2 ara-14 xyl-5 mtl-1 thr-1 leuB6</i> <i>proA2 his-4 argE3 his-328 recB21 recC22 sbcA23 rpsL31</i> <i>phi-1 tsx-33 λ-</i>	(Gillen <i>et al.</i> , 1981)

5.15 Plasmide, Cosmide und Bacterial Artificial Chromosomes (BACs)

Tabelle 4: Plasmide, Cosmide und BACs.

pRC/CMVgH	HCMV-IE Promotor/Enhancer, Amp ^r , Neo ^r , pA HCMVgH (UL57)	(Reschke, Diplomarbeit, 1990)
PGEM11zf	Amp ^r , <i>lacZ, T7- und SP6-</i> <i>Polymerasepromotoren</i>	(Yanisch- Perron <i>et al.</i> , 1985)
pCP15	Amp ^r , 2FRT, Kan ^r	(Cherepanow & Wackernagel, 1995)
pLXSN	5'LTR, 3'LTR, φ, P _{SV40} , Amp ^r , Neo ^r	Clontech, Heidelberg
pLNCX	5'LTR, 3'LTR, P _{CMV} φ, Amp ^r , Neo ^r ,	Clontech, Heidelberg
pCDNA3/pp71	HCMV-IE Promotor/Enhancer, Amp ^r , BGHpA, HCMVpp71 (UL82), SV40 Promotor, Neo ^r , SV40pA	(Baldick <i>et al.</i> , 1997)
pCM1075	Amp ^r , Tet ^r , λCos, HCMV nt 84864-119080	(Fleckenstein <i>et al.</i> , 1982) (Chee <i>et al.</i> , 1990)
pHB5	Cam ^r , HCMV Δnt 193361- 197397	(Borst <i>et al.</i> , 1999)
AD169ΔUS2-11	<i>gfp, Cam^r, AD169, ΔUS2- US11</i>	(Falk <i>et al.</i> , 2002)
pCP20	Amp ^r , Cam ^r , FLP ⁺ , λcl857 ⁺ , λpR, Rep ^{ts}	(Cherepanow & Wackernagel, 1995)

5.16 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Life Technologies (Groningen, Niederlande) und Sigma Ark (Darmstadt) bezogen.

Tabelle 5: Oligonukleotide.

Die Genomposition bezieht sich auf die publizierte vollständige Sequenz des Humanen Cytomegalievirus Stamm AD169 (Chee *et al.*, 1990). * bezeichnet die Position im Vektor *pRC/CMVgH*. ** bezeichnet die Position im Vektor *pCP15*. Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen.

Oligonukleotid	Sequenz	Genomposition
FIA1	5'-GTGAATTCGTATGGCGTAGTAGTACTC TGAGTTTTCTTAGC-3'	106693-106725
FIA2	5'-GTGAATTCGATATCTCTCTTCCCGA TGCCACCGTTC-3'	108521-108498
FIA-li 1	5'-GCGTCTTTATTTACGAGGTACTGTTA TGGG-3'	107741-107712
FIA-li 2	5'-CCACAATACTACATTTTAGCGGGCCC-3'	107254-107229
FIA-re	5'-GGGTGATGATGAGGCTCTGGCC-3'	108283-108304
FIB1	5'-GTGCTACTCGAGCGTGGAAGATGACCG AAGATAAGCAGC-3'	109368-109394
FIB2	5'-GTTCTAGAGCAGCACGTTTTCTC GTGCG-3'	110981-110961
FIB-re	5'-GGACATCTACCGTCGCTGTTGC-3'	110424-110446
gH-innen1	5'-GGACACGATCTGCTTTTC-3'	109533-109516
gH-innen2	5'-GTGGACCTGGCCAAACG-3'	108933-108917
gH-innen3	5'-CCTGCCTCTCACAAACACCACC-3'	108997-108976
pucgH1	5'-AACTGCAGATGCGGCCCGGCCTC-3'	110123-110118
pucgH1b	5'-CCGTAACAGCACGGTCGTCAGGG-3'	109937-109915
pucgH2	5'-CCCAAGCTTTCAGCATGTCTTGAGC-3'	107903-107918
RPCR1	5'-CGAAGGTAGGTGCATAGCGCGC TGCG-3'	5525-5602*
RPCR2	5'-GAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAAC-3'	5362-5985*
RPCR3	5'-AGCCGCGCTATGCACCTACCTTCG CAACGATATG-3'	5527-5612*
RPCR4	5'-CACCGACATCACCAGCCTCGTAC-3'	6777-6800*

RPCR5c	5'-GTTCTACAGTCAGTAGAGCAGATA GATGCCGATGATGGCCG-3'	7719-7777*
RPCR6c	5'-ATCTGCTCTACTGACTGTAGAACC TGACAGTTTATGAGAAAAGGG-3'	7737-7799*
RPCR7	5'-GCCTGGGGACTTTCACACCC-3'	872-892*
RPCR8b	5'-TGAGCATGCGGAGACGACTGTCG GTGGCGTCCACG-3'	7669-7757*
RPCR9b	5'-GACAGTCGTCTCCGCATGCTCAA GACATGCTGACTGTAGAAC-3'	7678-7777*
RPCR10c	5'-CTCACTACCTCTAGATTTTGAAAA CGGACCGGTCCTAGAAGTAACTGAC GTCGTCG-3'	7614-7670*
RPCR11	5'-GGACCGGTCGGTTTTTCAAATCTA GAGGTAGTGAG-3'	7614-7649*
RPCR12	5'-GGCCCGTACCGTTTTAGAAGATTTT GTGTG-3'	7820-7849*
RPCR13	5'-GTGGTGGTCTCATCTCCGCGAACTC ACTACC-3'	7592-7622*
SeqgHli	5'-GCTCCGCCAGAGGAC-3'	5835-5849*
SeqgHli2	5'-GGAAGCGGATGGGTCTC-3'	109978-109994
SeqgHre	5'-CGGCGCTCAACATTTAC-3'	108219-108202
USBhin	5'-GTCGCGATAGAGTTGATGTGACAGCCCG-3'	195182-195209
USBrück	5'-CATCCTAGCCACCGGTTGTAAACGC TTATG-3'	195580-195609
KanI	5'-CGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCC-3'	500-525**

5.17 Rekombinante Proteine

Die im Immunoblot verwendeten rekombinanten Proteinfragmente von pp65, pp150, gB und gH stammen von M. Andrassi (Doktorarbeit, 1996), Evaluation von M. Eggers (Eggers et al., 2001).

6. Methoden

6.1 Molekularbiologische Methoden

Soweit nicht anders angegeben, entsprechen die in der Arbeit angewendeten molekularbiologischen Methoden den Standardverfahren nach Sambrook *et al.* (1989).

6.1.1 Isolierung von Plasmid- DNA

Für die Isolierung von bis zu 20 µg Plasmid- DNA aus Bakterien wird das „QIAprep Spin Kit“ der Firma Qiagen, Hilden, entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet.

Für die Isolierung großer Mengen Plasmid- DNA wird das „QIAfilter Plasmid Maxi Kit“ nach den Angaben des Herstellers eingesetzt.

6.1.2 Isolierung von BAC- DNA

Für die Präparation kleiner Mengen BAC- DNA (bis 5 µg) wird die Methode der alkalischen Lyse nach Sambrook *et al.* (1989) leicht modifiziert. Es werden 9 ml einer Übernacht (ÜN)- Kultur 5 Minuten bei 3500 rpm (Rotina 48R) sedimentiert und der Überstand abgeschüttet. Das Bakterienpellet wird in 200 µl Lsg. 1 resuspendiert und in ein 2 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Zur Lyse der Zellen werden 300 µl Lsg. 2 zugegeben. Der Ansatz wird zehnmals vorsichtig invertiert und für 5 min bei RT inkubiert. Das Abstoppen der Lyse erfolgt durch Zugabe von 300 µl Lsg. 3, zehnmalsiges Invertieren und anschließender Inkubation für 10 Minuten bei 4 °C. Die denaturierten Proteine und die daran assoziierte genomische DNA werden durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 13000 rpm (MinifugeT) abgetrennt und der klare, die Plasmide enthaltende Überstand in einem neuen Reaktionsgefäß durch Zugabe von 600 µl Isopropanol gefällt. Die präzipitierte Plasmid- DNA wird durch erneute Zentrifugation bei 13000 rpm für 20 min

sedimentiert, mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen, kurz getrocknet und in 200 µl EB-Puffer aufgenommen.

Lsg. 1 (pH 8,0)

Glucose	50 mM
EDTA	10 mM
Tris/HCL	25 mM
RNase A	20 µg/ml

Lsg. 2 (pH 12,5 – 13,5)

NaOH	0,2 M
SDS	1 % (w/v)

Lsg. 3

Kaliumacetat	3 M
--------------	-----

EB- Puffer (pH 8,5)

Tris/HCl	10 mM
----------	-------

Für die Isolierung großer Mengen BAC- DNA wird das „Nucleobond PC500 Kit“ der Firma Macherey/Nagel, Düren, verwendet. Die Präparation wird entsprechend dem vom Hersteller angegebenen Protokoll für die Isolierung von Cosmiden/Low Copy Plasmiden durchgeführt.

6.1.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA in wässriger Lösung wird in einer Quarzküvette gegen einen Blindwert von *a. bidest* photometrisch bestimmt. Dazu wird ein „Gene Quant II RNA/DNA Calculator“ der Firma Pharmacia, Freiburg, verwendet. Einer $\Delta E_{260\text{nm}}$ von 1 entsprechen dabei näherungsweise Konzentrationen von 50 µg/ml für doppelsträngige DNA, 40 µg/ml für einzelsträngige DNA und 20 µg/ml Oligonukleotide (Sambrook et al., 1989).

6.1.4 Restriktion von Nukleinsäuren

Zur analytischen Restriktion von DNA werden 0,2–1 µg Plasmid- DNA bzw. 1-2 µg BAC- DNA eingesetzt. Präparative Restriktionen aus Plasmiden werden mit 5-20 µg DNA durchgeführt. Es werden Endonukleasen und Pufferlösungen der Firma New England Biolabs, Beverly, USA, den Angaben des Herstellers entsprechend verwendet.

6.1.5 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von geschnittener Plasmid- DNA zur Analyse oder zur Gewinnung definierter Fragmente erfolgt in 1 %igen Agarosegelen in 1x TAE- Puffer. Für die Elektrophorese wird eine horizontale Gelkammer (BioRad, München) verwendet und eine Spannung von 8 V/cm Gellänge angelegt.

Die Auftrennung von BAC- DNA nach analytischer Restriktion erfolgt in 0,8 %igen Agarosegelen in 0,5x TBE- Puffer. Die angelegte Spannung beträgt hier 4 V/cm Gellänge.

Alle DNA- Proben werden vor dem Auftragen auf das Gel mit 6x DNA- Probenpuffer versetzt. Die Agarosegele enthalten eine Endkonzentration von 0,2 µg/ml Ethidiumbromid. Als Größenmarker wird die 1 kb- Ladder (GibcoBRL, Karlsruhe) zur photographischen Dokumentation eine Polaroid Photoausrüstung der Firma Kodak, Stuttgart, verwendet.

TBE- Puffer siehe 5.11

TAE- Puffer siehe 5.11

6x DNA- Probenpuffer

Glycerin 30,00 % w/v

Bromphenolblau 0,25 % w/v

Xylenxyanol 0,25 % w/v

a. bidest

6.1.6 Elution von DNA aus Agarosegelen

Zur Elution definierter DNA Fragmente aus Agarosegelen nach präparativer Restriktion wird das „QIAquick Gel Extraction Kit“ der Firma Qiagen, Hilden, gemäß den Angaben des Herstellers verwendet.

6.1.7 Dephosphorylierung linearer DNA- Fragmente

Zur Entfernung der 5'- Phosphatgruppen linearer DNA- Fragmente wird die „calf intestine alkaline phosphatase“ sowie die dazugehörige Pufferlösung der Firma Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Durch die Dephosphorylierung wird die Wahrscheinlichkeit einer Religation des Vektors verringert.

6.1.8 Auffüllreaktion überhängender 5'- Enden

Für die Auffüllreaktion überhängender 5'- Enden linearisierter DNA wird das Klenow- Fragment der DNA- Polymerase I (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) verwendet, welche eine 5'=>3'- Polymerase- und 3'=>5'- Exonuklease-, nicht aber die 5'=>3' Exonukleaseaktivität besitzt. Die Reaktion wird nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

6.1.9 Ligation von DNA- Fragmenten

Die Ligation linearisierter Vektor- und Insert- DNA erfolgt mittels der T4- DNA- Ligase (MBI Fermentas, St. Leon Roth), welche unter ATP- Verbrauch 3'- OH- mit 5'- Phosphat- Enden verbindet. Die linearisierte Vektor- DNA wird je nach Größenverhältnis in einem molaren Verhältnis von 1:5 bis 1:10 zur Insert- DNA eingesetzt. Verwendet werden für einen 20 µl- Ansatz 10 ng Vektor- DNA, die entsprechende Menge Insert- DNA, eine Einheit der T4- DNA- Ligase und 2 µl des

mitgelieferten ATP- haltigen Puffers (1 mM ATP). Die Inkubationszeiten bei 20 °C variieren zwischen 2 und 24 Stunden.

6.1.10 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*- Zellen

Zur Herstellung elektrokompetenter Bakterien werden 100 ml TB- Medium 1: 400 mit einer ÜN- Kultur beimpft und für 5 – 6 Stunden bis zu einer OD₅₉₅ von 2 auf einem Schüttler bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Die Verwendung von TB- Medium ermöglicht eine Kultivierung der Bakterien bis zu dieser hohen Zelldichte, ohne dass sie ihre Fähigkeit verlieren, Fremd- DNA aufzunehmen (Mülhardt, 2000). Die Bakterien werden auf 4 °C abgekühlt und durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 5000 rpm (Rotina 48R) sedimentiert. Das Bakterienpellet wird fünfmal mit 50 ml eiskaltem *a. bidest* gewaschen und in 2 ml *a. bidest* in 10 % Glycerin (w/v) resuspendiert. Die Bakterien werden entweder direkt für die Elektroporation verwendet oder als 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

TB- Medium

siehe 5.10

6.1.11 Transformation elektrokompetenter Bakterien.

50 µl der elektrokompetenten Bakterien werden mit 1 µl Ligationsansatz, Plasmid- oder BAC- DNA vermischt und in eine Elektroporationsküvette (BioRad, München) gefüllt. Ein Puls mit einer Spannung von 2,5 kV, einer Kapazität von 25 µF und einem elektrischen Widerstand von 200 Ω (Gene Pulser, Biorad) ermöglicht die Aufnahme der DNA. Die Bakterien werden mit 950 µl SOC- Medium versetzt, in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt, für 60 Minuten bei 37 °C zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz inkubiert und anschließend auf LB- Agarplatten ausplattiert, die das entsprechende Antibiotikum in der jeweils benötigten Konzentration enthalten, d. h. Ampicillin 100 µg/ml, Chloramphenicol 17 µg/ml, Kanamycin 30 µg/ml.

SOC- Medium (pH 7,0)

siehe 5.10

LB- Agar

siehe 5.10

6.1.12 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR (Mullis, 1986) wird entweder für den qualitativen Nachweis eines gesuchten DNA- Abschnittes, zur Produktion von Fragmenten für Subklonierungen oder zur gerichteten Mutagenese verwendet. Das Prinzip dabei ist die exponentielle enzymatische Vermehrung eines spezifischen DNA- Abschnittes, der von zwei Oligonukleotid- Primern begrenzt ist, die gegenläufig an komplementäre DNA- Stränge gebunden sind. Für die Amplifikation verwendet man eine thermostabile Polymerase, so dass eine zyklische Abfolge von Denaturierung der DNA- Doppelstränge, Hybridisierung der Oligonukleotide mit der DNA und eine Kettenverlängerung bei der für jeden Reaktionsschritt optimalen Temperatur stattfinden kann.

Die Reaktionen werden in 200 µl- Reaktionsgefäßen in einem „GeneAmp PCR System 2400“ (Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt.

Zunächst wird die DNA- Matrize je nach Größe zwischen 30 Sekunden und 3 Minuten vollständig denaturiert. Danach folgt der Reaktionszyklus, der 30 bis 40 mal wiederholt wird: Im ersten Schritt wird die DNA erneut für 30 bis 60 Sekunden denaturiert, im zweiten folgt die Hybridisierung der Oligonukleotide für 20 bis 30 Sekunden. Die Temperatur für die Anlagerung der Oligonukleotide richtet sich nach ihren jeweiligen Schmelztemperaturen, die nach folgender Formel berechnet werden: $T_M (°C) = 81,5 + 0,41 \times (\% \text{ GC- Gehalt}) - 600/N + 16,6 \times \log M$, wobei N für die Anzahl der bindenden Nukleotide des Oligonukleotids steht und $\log M$ der dekadische Logarithmus der Molarität der Na^+ - und K^+ - Konzentration ist (Sambrook *et al.*, 1989). Die Dauer des folgenden Amplifikationsschrittes bei 72 °C richtet sich nach der Größe des erwarteten Fragments und wird mit 1 Minute/1000 bp kalkuliert. Eine abschließende Inkubation bei 72 °C für 7 Minuten dient der Vervollständigung der Amplifikate.

Die Reaktionsansätze enthalten je 200 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP (Applied Biosystems), 10 bis 50 pmol Oligonukleotide, 20 – 200 ng DNA- Matrize und 2,5 bis 5 Einheiten DNA- Polymerase bei einem Gesamtvolumen von 50 µl.

Es werden Reaktionspuffer und AmpliTaq[®] - DNA- Polymerase der Firma Applied Biosystems, Weiterstadt, verwendet.

6.1.13 Reinigung von PCR- Produkten

Für die Entfernung von Salzen und Oligonukleotiden aus der abgeschlossenen PCR-Reaktion sowie für die Entsalzung von Restriktionsansätzen wurde das „QIAQuick PCR Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet.

6.1.14 Mutagenese durch rekombinante PCR

Die Mutagenese durch rekombinante PCR wird zur gezielten Deletion von DNA-Abschnitten verwendet. Bei dieser Methode werden in zwei unabhängigen PCR-Reaktionen zunächst die Abschnitte amplifiziert, welche die zu deletierende Region flankieren (Abb. 6, PCR a und b). Die an den zu deletierenden Bereich angrenzenden Oligonukleotide 2 und 3 tragen hierbei jeweils einen Abschnitt von ca. 10 überhängenden Basenpaaren am 5'- Ende, die erst wieder zur DNA jenseits der Deletion homolog sind. Da jeder dieser Oligonukleotide aber auch 20 bp enthält, die diesseits der Deletion binden, kann man durch geeignete Temperaturwahl eine zu diesem Zeitpunkt noch nicht gewünschte Hybridisierung der überhängenden Enden an ihre komplementären Bereiche verhindern. Die jeweiligen Gegenoligonukleotide 1 und 4 werden so positioniert, dass sie einen Bereich der DNA mit einschließen, in dem sich eine singuläre Schnittstelle des zu mutagenisierenden Gens befindet. Die ursprüngliche DNA- Matrize wird durch *DpnI*- Behandlung entfernt.

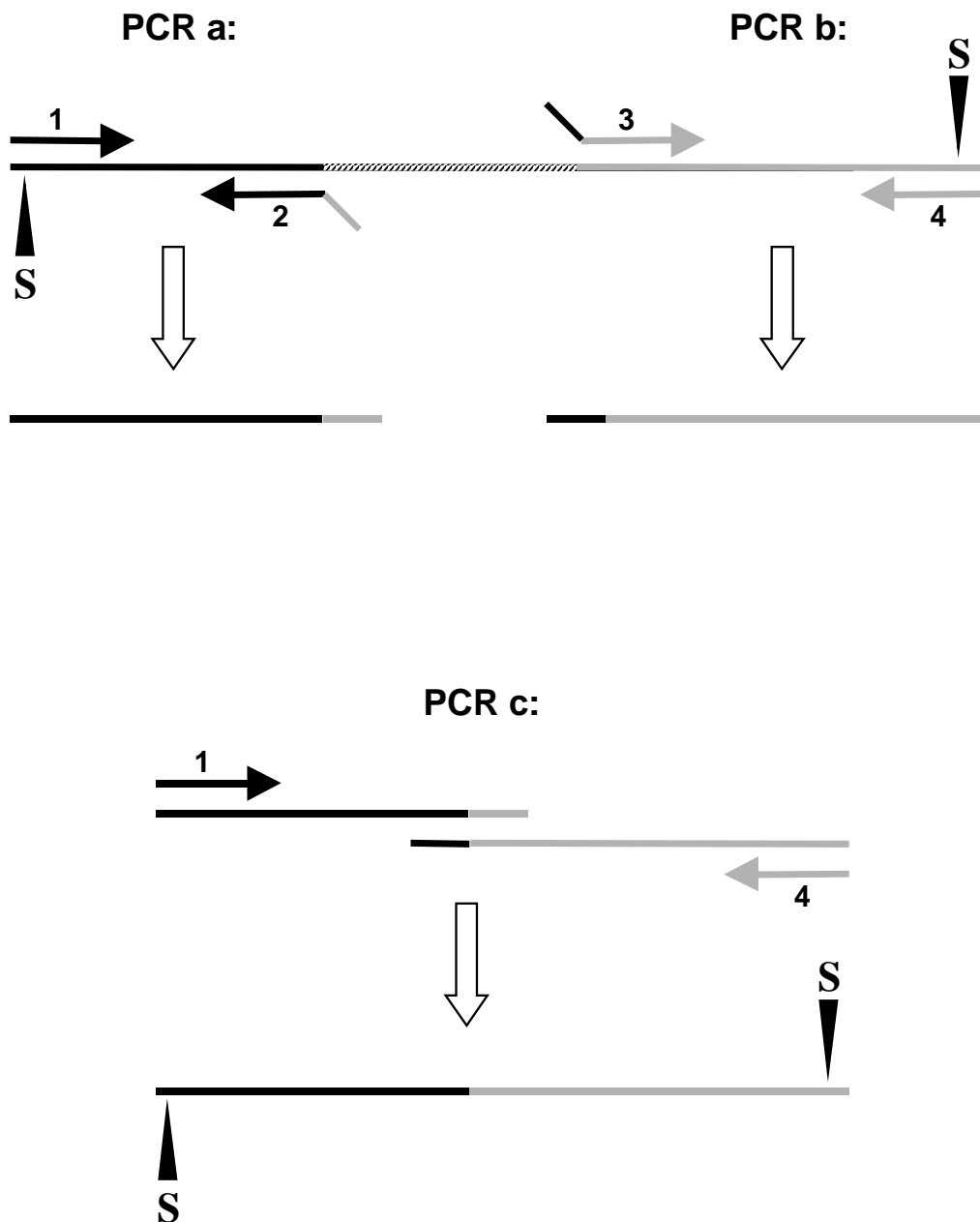


Abbildung 6: Einbringen von Deletionen in Plasmide durch rekombinante PCR.
S = singuläre Restriktionsendonukleaseschnittstelle.

In einer dritten PCR werden die *DpnI* behandelten Amplifikate aus PCR a und b als Matrize eingesetzt (Abb. 6, PCR c). Durch die in den Reaktionen a und b eingebrachten Überhänge, die komplementär zueinander sind, kommt es zu einer Hybridisierung der Amplifikate miteinander. Beide können jetzt mit den Oligonukleotiden 1 und 4 amplifiziert werden. Mittels Restriktion an den singulären Schnittstellen kann nun der ursprüngliche Bereich aus dem Plasmid entfernt und

durch den amplifizierten Bereich mit der gewünschten Deletion in einer Ligationsreaktion (s. 6.1.9) ersetzt werden.

6.1.15 Mutagenese mittels Exo Mung Bean Deletion Kit

Durch dieses Verfahren können in ein Gen unidirektionale Deletionen vorhersagbarer Größe eingeführt werden. Genutzt wird hierbei die Eigenschaft der Exonuclease III, 3'- Enden von 5'- Überhängen zu entfernen oder „blunt Enden“ zu verkürzen. 3'- Einzelstrangüberhänge werden nicht verdaut.

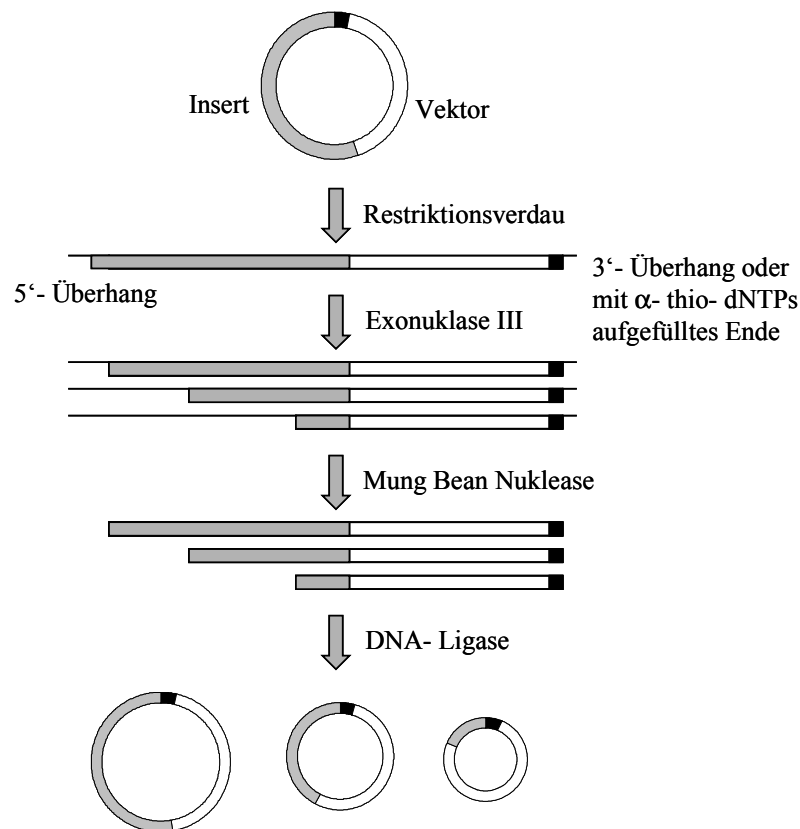


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Mutagenisierung mittels Exonuclease- Verdau. Erläuterungen siehe Text.

Es wird ein Doppelrestriktionsverdau mit dem zu mutagenisierenden Gen durchgeführt und dazu ein Restriktionsenzym verwendet, welches nach Restriktion 3'- Einzelstrangüberhänge hinterlässt und ein weiteres, welches 5'- Überhänge oder „blunt“ Enden hinterlässt (Abb. 7). Der 3'- Einzelstrangüberhang, welcher den Vektor bei dem anschließenden Restriktionsverdau schützen soll, muss zwischen

dem 5'-Überhang oder „blunt Ende“ und dem Vektoranteil liegen. Ist es nicht möglich, einen schützenden 3'-Einzelstrangüberhang einzuführen, kann auch ein 5'-Überhang mit Deoxythionukleotiden mithilfe der Klenow- Polymerase aufgefüllt werden.

Es folgt ein Verdau der DNA mittels der Exonuclease III. Durch Veränderung der Temperatur kann die Geschwindigkeit der enzymatischen Verkürzung der DNA gesteuert werden. Nach bestimmten Inkubationszeiten werden einzelne Aliquots aus dem Ansatz entfernt, erhitzt, um die Exonuclease III zu inaktivieren, 30 Minuten bei 30 °C mit Mung Bean Nuclease inkubiert, um überhängende Einzelstränge abzudauen, und dann blunt religiert. Nach Transformation in Epicurian Coli JM109-Zellen und Ausplattieren auf LB- Platten, die mit Ampicillin (100 µg/ml) versetzt sind, können die entstehenden Klone auf die genaue Größe der Deletion hin untersucht werden.

6.1.16 BAC- Mutagenese mit linearen Fragmenten

Diese Art der Mutagenese stellt eine schnelle Möglichkeit zum Einbringen gezielter Deletionen in die großen BAC- Moleküle dar (Adler *et al.*, 2000, Borst *et al.*, 2001, Muyrers *et al.*, 1999). Dazu wird ein selektionierbarer genetischer Marker, wie z.B. das Gen für Kanamycin, mittels PCR (s. 6.1.12) amplifiziert. Die für die spezifische, gezielte Rekombination an beiden Seiten des Markers notwendigen homologen Regionen (Abb. 8 a und b) sind bei dieser Methode nur 50- 60 bp lang und werden durch nichtkomplementäre Überhänge an den 5'- Enden der Oligonukleotide zur Verfügung gestellt, so dass in nur einer PCR- Reaktion die komplette Kasette für die homologe Rekombination hergestellt werden kann. Die Resistenzkasette im linearen Fragment wird flankiert von zwei kurzen Sequenzwiederholungen von 65 bp, den FRT- Sequenzen (FRT = *Flp- Recombinase- Target sites*).

Für die Rekombination werden zunächst Bakterien (*E.coli* JC8679) mit dem parentalen BAC- Plasmid pHB5 transformiert (s. 6.1.11, Abb. 8, 1).

Diese Bakterien werden nun zusätzlich mit dem amplifizierten linearen DNA-Fragment transformiert und vor dem Ausplattieren auf LB- Agarplatten (17 µg/ml Chloramphenicol (Cam) und 30 µg/ml Kanamycin (Kan)) für eine Stunde bei 37°C in LB- Medium inkubiert. Durch homologe Rekombination zwischen dem BAC-

Plasmid und dem linearen Fragment kann die Kanamycinresistenz in das BAC integrieren (Abb. 8, 2 und 3). Kanamycinresistente Bakterienklone werden durch Restriktion (6.1.4) überprüft.

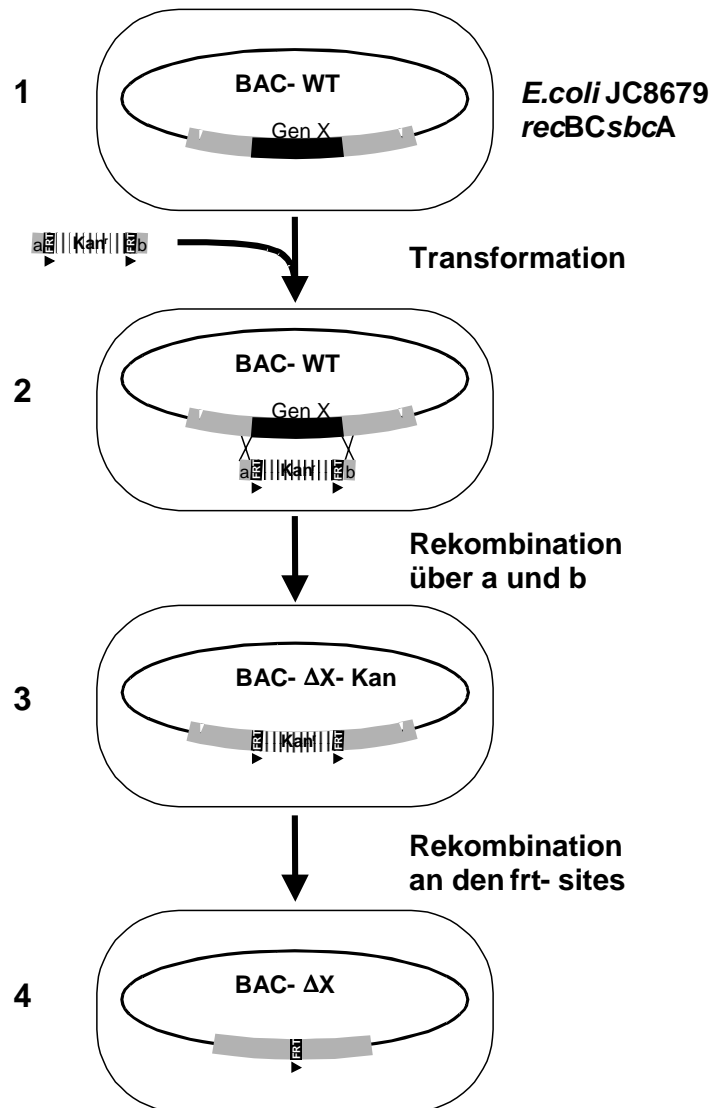


Abbildung 8: Schematische Darstellung der BAC-Mutagenese mit linearen Fragmenten.
Abkürzungen: Kan^r = Kanamycinresistenzgen, FRT = Flp-Recombinase Erkennungssequenz.

Um die Kanamycinresistenz wieder zu entfernen, wird das Plasmid pCP20 (s. 5.15) in Bakterien elektroporiert, die bereits das mutagenisierte BAC-Plasmid tragen. pCP20 codiert für das Enzym *Flp*-Recombinase (Cox, 1983), das die Rekombination zwischen zwei FRT-Sequenzen katalysiert. Die FRT-Sequenzen, die das Kanamycin-Gen flankieren, liegen in der gleichen Orientierung vor, so dass nach

dem Auflösen der homologen Rekombination der dazwischenliegende Genabschnitt entfernt wird (Abb. 8, 4). Eine der FRT- Sequenzen verbleibt nach der Rekombination im BAC. Das Flp- Gen im Plasmid steht unter der Kontrolle des Bakteriophagen- λ - P_R - Promotors, der wiederum vom temperatursensitiven λ - Repressor cI857 reguliert wird.

Ausserdem trägt das Plasmid pCP20 einen temperatursensitiven Replikationsursprung. Die Inkubation bei 30 °C erfolgt zunächst auf Agarplatten, die zur Selektion der BAC- Plasmide 17 μ g/ml Cam und zur Selektion des Plasmides pCP20 100 μ g/ml Ampicillin (Amp) enthalten. Die Bakterien werden erneut ausplattiert, in diesem Schritt auf Agarplatten, die nur Chloramphenicol enthalten. Die Inkubation erfolgt für 16 h bei 43 °C, um die Expression der *Flp*- Rekombinase zu induzieren. Die entstandenen Klone werden durch paralleles Ausplattieren auf Agarplatten sowohl mit Cam und Kan als auch auf Platten nur mit Cam und Inkubation bei 37 °C auf den Verlust des Kan- Resistenzgens hin überprüft. Die kanamycinsensitiven Klone werden durch Restriktionsendonukleasebehandlung (s. 6.1.4) analysiert. Zur Amplifikation der rekombinanten BAC- DNA wird diese aus den *E. coli* JC8679 isoliert und in *E. coli* DH10B transformiert.

6.1.17 DNA- Sequenzierung

Die hier angewandte Sequenzierreaktion basiert auf einer modifizierten Kettenabbruchmethode mit Didesoxynukleotiden (Sanger et al., 1977). Dabei wird der „ABI PRISM BigDye Terminator cycle ready reaction mix“ der Firma Applied Biosystems, Weiterstadt, verwendet. Die verschiedenen Didesoxynukleotide sind hierbei mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, so dass eine Analyse der Probe in nur einer Gelspur erfolgen kann.

Für die Reaktion werden 0,5-1 μ g DNA, 20 pmol des Sequenzier- Oligonukleotids und 4 μ l des Reaktionsmixes, in dem die fluoreszenzmarkierten Oligonukleotide, der Reaktionspuffer und die Polymerase bereits enthalten sind, eingesetzt. Nach dem Auffüllen des Reaktionsvolumens mit *a. bidest* auf 20 μ l kann die zyklische Reaktion gestartet werden (GeneAmp PCR System 2400). In 25 Zyklen wird die Probe zunächst für 30 Sekunden auf 96 °C erhitzt, es folgt die Anlagerung der Oligonukleotide für 30 Sekunden bei 50 °C und die anschließende Polymerisation für vier Minuten bei 60 °C. Nach der Reaktion wird die Probe mit 80 μ l *a. bidest*

aufgefüllt und durch Zugabe von 0,1 Volumenteil 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und zweieinhalb Volumenteilen Ethanol (96 %) präzipitiert. Nach 30- minütiger Zentrifugation bei 13000 rpm (Biofuge pico) wird der Überstand entfernt, das Sediment mit 200 µl Ethanol (70 %) gewaschen und die DNA in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Das Präzipitat wird in 3 µl Sequenzierprobenpuffer resuspendiert und vor dem Auftragen auf das Sequenziergel für fünf Minuten bei 95 °C denaturiert.

Alternativ wird die Aufreinigung der Proben über die Centri-Sep Columns (Princeton Separations, Adelphia, USA) nach Herstellerprotokoll durchgeführt.

Die Sequenzierproben werden in einem 5 %igen Harnstoff- Polyacrylamidgel mit einem ABI PRISMTM377 Sequencer der Firma Applied Biosystems, Weiterstadt, aufgetrennt. Die Aufnahme der Rohdaten erfolgt mittels eines Argonlasers, der die Fluoreszenzfarbstoffe zur Emission anregt. Die Lichtimpulse werden mit einer Kamera aufgenommen und zur Auswertung digitalisiert. Mit einem Computerprogramm (ABI PRISMTM377 Data Collection Program) können die Sequenzierdaten errechnet und ausgedruckt werden.

Sequenzierprobenpuffer

Formamid	80 % (v/v)
Dextranblau	1 % (v/v)
EDTA	5 mM

a. bidest

6.2 Zellbiologische Methoden

6.2.1 Kultivierung von humanen Fibroblasten und COS7- Zellen

Die Kultivierung der primären embryonalen Lungenfibroblasten (MRC5) und der COS7- Zellen erfolgt bei 37 °C, bei 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit in „Dulbeccos Modified Eagles Medium“ (DMEM, Life Technologies) mit 10 % (v/v) fötalem Kälberserum (FCS). Nach Erreichen der Konfluenz wird das Kulturmedium abgesaugt, der Monolayer einmal mit PBS- Puffer gewaschen und die Zellen mit Trypsin/EDTA- Lösung (40 µl/cm² Monolayer; Life Technologies, Karlsruhe) bei 37 °C abgelöst. Durch vorsichtiges Pipettieren werden die Zellen resuspendiert und im

Verhältnis 1:3 (Fibroblasten) oder 1:10 (COS7- Zellen) in neue Kulturflaschen überführt.

PBS- Puffer

siehe 5.11

6.2.2 Einfrieren/Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren von Zellkulturen werden diese kurz vor Erreichen der Konfluenz mit Trypsin/EDTA- Lösung abgelöst (siehe 6.2.1). Das Trypsin wird durch Zugabe von 3 ml FCS (BioWhitaker, Verviers, Belgien) inaktiviert und die Zellen bei 750 rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur sedimentiert (Rotina 48R). Das Zellsediment wird in eiskaltem DMEM mit 40 % FCS aufgenommen ($1 \text{ ml}/5 \times 10^6$ Zellen) und mit dem gleichen Volumen eiskaltem DMEM mit 20 % Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt. Die Zellsuspension wird in 1 ml Aliquots (je $2,5 \times 10^6$ Zellen) in Polypropylen-Röhrchen (Nunc, Wiesbaden) gefüllt und zunächst für 24 h bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. Zur langfristigen Lagerung werden die Zellen in flüssigem Stickstoff ($-196 \text{ }^\circ\text{C}$) aufbewahrt.

Eingefrorene Zellen werden im $37 \text{ }^\circ\text{C}$ Wasserbad aufgetaut und sofort in eine 25 cm^2 - Zellkulturflasche mit 5 ml DMEM (10 % (v/v) FCS) überführt. 24 h nach dem Aussäen der Zellen wird das Kulturmedium gewechselt, da das enthaltene DMSO bei Erwärmung toxisch auf die Zellen wirkt.

6.2.3 Virusanzüchtung und Infektion von Zellen

Zur Herstellung von Virusstocks werden konfluente HF- Monolayer in 162 cm^2 - Kulturflaschen mit einer moi von 0,01 infiziert. Dazu wird das DMEM mit 10 % (v/v) FCS gegen 10 ml DMEM ohne FCS ausgetauscht und die Virussuspension zugegeben. Nach 1 Stunde Schwenken bei Raumtemperatur wird das DMEM wieder auf ein Gesamtvolumen von 40 ml aufgefüllt und 10 % (v/v) FCS zugegeben.

Nachdem etwa 50 % der Zellen eine deutliche zytopathische Veränderung zeigen, wird das Kulturmedium erneut gewechselt und das Medienvolumen auf 25 ml verringert. Nach weiteren fünf bis sechs Tagen wird der Kulturüberstand geerntet und durch niedertourige Zentrifugation für 10 Minuten bei 3500 rpm (Rotina 48R)

von Zellbestandteilen getrennt. Der zellfreie virushaltige Überstand wird aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

6.2.4 Virustitration

Zur Titration von Virusstocks werden MRC5- Zellen 16 h nach Aussaat in 24er well Platten mit dem 1:10 bis 1:100.000 verdünnten Virusstock infiziert (s. 6.2.3). Nach 48 h wird eine Immunfluoreszenz auf IE- Proteine durchgeführt (s. 6.3.2) und die IE-positiven Kerne bei geeigneter Verdünnung ausgezählt. Aus der Anzahl der Kerne, dem Grad Verdünnung sowie der Menge des eingesetzten Virusstocks wird der Titer des Virusstocks errechnet (Strive, Doktorarbeit, 2001).

6.2.5 Isolierung viraler DNA

Die Gewinnung von bis zu 10 μg viraler DNA als Matrize für PCR- Reaktionen wird aus 200 μl Virusstock mit dem QIAamp Mini Kit nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

6.2.6 Transiente Transfektion von COS7- Zellen

Zur transienten Transfektion von COS7- Zellen wird das „Lipofectin[®]- Reagenz“ (Life Technologies, Karlsruhe) verwendet. Das Reagenz besteht nach Herstellerangaben aus einem Gemisch kationischer Lipide, die nach Komplexierung mit DNA die Aufnahme von Fremd- DNA in die Zellen vermitteln.

Zur Transfektion werden exponentiell wachsende COS7- Zellen verwendet, die in Zellkulturschalen (\varnothing 3 cm) mit Glasplättchen (\varnothing 12 mm) kultiviert werden. Für die Transfektion wird zunächst Lösung A bestehend aus 250 μl Opti-Mem[®]I (Life Technologies) und 15 μl Lipofectin[®]- Reagenz angesetzt. Dann wird Lösung B bestehend aus 250 μl Opti-Mem[®]I und 5 μg Plasmid- DNA zugegeben, vermischt und für 15 min bei RT inkubiert. Die Zellen werden zweimal mit Opti-Mem[®]I gewaschen und mit dem Transfektionsansatz (Lösung A + B) überschichtet. Das Transfektionsmedium wird nach 8 – 24 h durch frisches DMEM mit 10 % (v/v) FCS ersetzt und die Transfektion nach 48 h ausgewertet.

6.2.7 Transfektion von MRC5- Zellen mit BAC- DNA

Die Transfektion von BAC- DNA erfolgt mittels des „MBS- mammalian transfection Kit“ (Stratagene), nach der Methode der Calciumphosphatpräzipitation von Nukleinsäuren (Chen & Okayama, 1987). Dazu werden MRC5- Zellen 16 Stunden vor Transfektion im Verhältnis 1:1,2 geteilt und in Zellkulturschalen (\varnothing 3 cm) ausgesät. 1 μ g BAC- DNA, 4 μ g Lachs- Sperma- DNA (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) sowie 1 μ g des Plasmides pCDNA3pp71 (s. 5.15) zur Erhöhung der Effizienz werden mit *a. bidest* auf ein Volumen von 75 μ l gebracht. Nach Zugabe von 8,3 μ l Sol I wird der Ansatz vorsichtig durch Drehen des Gefäßes vermischt, um ein mechanisches Scheren der DNA zu vermeiden. Nach Zugabe von 83,3 μ l Sol II wird erneut vorsichtig gemischt und der Reaktionsansatz zur Ausbildung der Präzipitate für 20 – 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Zellen werden einmal mit DMEM gewaschen und mit 800 μ l DMEM überschichtet, welches 6 % (v/v) Sol III enthält. Der Präzipitationsansatz wird tropfenweise auf den Zellen verteilt, vorsichtig geschwenkt und für 3 – 4 Stunden im CO₂- begasten Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

Um die Aufnahmeeffizienz zu verstärken, werden die Zellen anschließend mit einem osmotischen Schock behandelt. Dazu wird der Transfektionsansatz abgesaugt und durch 1 ml eiskalte Glycerolschocklösung ersetzt. Nach exakt zwei Minuten werden 2 ml DMEM zugegeben. Das Gemisch wird abgesaugt und die Zellen vor der Zugabe von 5 ml DMEM mit 10 % FCS noch zweimal mit DMEM gespült.

Die Transfektion der pt67- Helferszelllinie erfolgt nach dem gleichen Protokoll.

Sol I

CaCl₂

2,5 M

Sol II

Die Zusammensetzung wird vom Hersteller nicht angegeben

Sol III

modifiziertes Rinderserum

Glycerolschocklösung (pH 7,13)

Hepes	25 mM
Na ₂ HPO ₄	0,75 mM
NaCl	140 mM
Glycerin	20 % (w/v)

a. bidest

Die Lösung wird sterilfiltriert.

6.2.8 Kotransfektion von MRC5- Zellen mit BAC- DNA und Expressionsplasmiden bzw. Cosmiden

Die Kotransfektionen von BAC- DNA und Expressionsplasmiden erfolgt ebenfalls mittels des MBS- Mammalian Transfection Kit (Stratagene, La Jolla, USA; s. 6.2.7). Die primären embryonalen Lungenfibroblasten (MRC5) werden 16 Stunden vor Transfektion im Verhältnis 1:1,2 geteilt und in 24er- Zellkulturschalen (Ø 1,2 cm) mit Deckgläsern ausgesät. 1 µg BAC- DNA, 4 µg Expressionsplasmid bzw. Cosmid sowie 1 µg des Plasmides pcDNA3pp71 (s. 5.15) werden mit *a. bidest* auf ein Volumen von 75 µl gebracht. Nach Zugabe von 8,3 µl Sol I wird der Ansatz vorsichtig durch Drehen des Gefäßes vermischt, um ein mechanisches Scheren der DNA zu vermeiden. Nach Zugabe von 83,3 µl Sol II wird erneut vorsichtig gemischt und der Reaktionsansatz zur Ausbildung der Präzipitate für 20– 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Zellen werden einmal mit DMEM gewaschen und mit 200 µl DMEM mit 6 % (v/v) Sol III überschichtet. Der Präzipitationsansatz wird tropfenweise auf vier Vertiefungen der Zellkulturschale verteilt, vorsichtig geschwenkt und für 3- 4 Stunden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Auch bei den Kotransfektionen werden die Zellen anschließend einem osmotischen Schock ausgesetzt. Der Transfektionsansatz wird abgesaugt und durch 200 µl eiskalte Glycerolschocklösung ersetzt. Nach exakt zwei Minuten wird der osmotische Schock durch Zugabe von 400 µl DMEM gestoppt. Das Gemisch wird

abgesaugt, jeder Ansatz zweimal mit 400 µl DMEM gespült und nach der Zugabe von 1 ml DMEM mit 10 % (v/v) FCS bis zur Auswertung im begasten Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

Sol I, Sol II, Sol III

siehe 6.2.7

Glycerolschocklösung (pH 7,13)

siehe 6.2.7

6.3 Immunologische und proteinbiochemische Methoden

6.3.1 Aufreinigung eines spezifischen gH- Antikörpers

Die Aufreinigung eines spezifischen gH- Antikörpers aus menschlichem Serum wird unter Verwendung einer C16/20- Säule (Pharmacia, Freiburg) durchgeführt, die als Säulenmaterial ein Gemisch aus Affi- Gel 10 und 15 in einem Verhältnis von 1:2 enthält. Affi- Gel 10 unterstützt die Kopplung von sauren, Affi- Gel 15 hingegen die Kopplung von basischen Proteinen. An dieses Trägermaterial wird das Fusionsprotein 5, das den immundominanten 14,2 kD großen aminoterminalen Bereich von gH und den entsprechenden prokaryontischen β - Galaktosidaseanteil enthält, gebunden (E. Reis, Diplomarbeit, 1991).

20 ml eines Serums, das im ELISA als HCMV- Antikörper positiv getestet worden war, werden im Verhältnis 1:3 mit Startpuffer vorverdünnt und mit einer Flußrate von 0,5 ml/min über die Säule gepumpt. Anschließend wird die Säule mit dem 10-fachen Säulenvolumen an Startpuffer gewaschen.

Die Elution des gebundenen Antikörpers erfolgt mit 70 ml Elutionspuffer. Das Eluat wird mittels eines Fraktionssammlers in 3,5 ml- Fraktionen in Reagenzgläsern aufgefangen, in denen 1,5 ml Tris/HCl (2,5 M, pH 8,0) vorgelegt wurde, um den sauren pH der Eluate zu neutralisieren.

Die Chromatographiesäule wird anschließend mit dem 20- fachen ihres Volumens an *a. bidest* gefolgt von der gleichen Menge Startpuffer gewaschen und bei 4 °C gelagert.

Die 19 Fraktionen des spezifischen gH- Antikörper (pabgH) werden anschließend im Immunoblot mit rekombinantem gH- Antigen getestet und bis zur weiteren

Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Der pabgH wurde für Immunfluoreszenzen und im Western Blot 1:5 in 3 % BSA verdünnt eingesetzt.

Startpuffer

NaCl	150 mM
Tris/HCl (pH 8,0)	50 mM
Natriumazid	0,2 % (w/v)

a. bidest

Elutionspuffer

Glycin/HCl (pH 2,5)	200 mM
---------------------	--------

a. bidest

6.3.2 Fixierung und indirekte Immunfluoreszenz von Zellen

Zur Auswertung der *enhanced green fluorescent protein* (EGFP)- Autofluoreszenz von Zellen werden Deckglaskulturen nach einmaligem Waschen mit PBS- Puffer durch Zugabe von Paraformaldehydlösung für 20 Minuten fixiert, mit PBS- Puffer gewaschen und direkt in Mowiol- Lösung eingedeckt.

Zellen, in denen die Kolokalisation von EGFP mit gH, gB oder IE gezeigt werden sollte, werden nach der Paraformaldehydfixierung mit NH_4Cl - Lösung behandelt, um unspezifische Bindungen abzusättigen, mit PBS- Puffer gewaschen und mit einer 0,02 %igen Triton X100- Lösung permeabilisiert. Danach erfolgt die indirekte Immunfluoreszenz auf das neben EGFP nachzuweisende Protein (s. u.).

Alternativ werden konfluente, auf Deckgläschen gewachsene Zellkulturen zunächst mit PBS- Puffer gewaschen und anschließend mit einem Gemisch aus Ethanol/Aceton (1:1, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) für 5 Minuten fixiert. Nach dem Abdampfen des Fixierungsgemisches werden die Zellen für 15 Minuten in BSA- Puffer rehydriert. Auf diese Weise werden Zellen fixiert, in denen keine EGFP- Autofluoreszenz nachgewiesen werden sollte.

Die fixierten und rehydrierten Deckglaskulturen werden in einer feuchten Kammer für 45 – 60 Minuten mit einem spezifischen Erstantikörper inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS- Puffer erfolgt eine Inkubation mit einem 1:50 bis 1:500

verdünnten, Fluorochrom- markierten Zweitantikörper für 45- 60 Minuten. Im Anschluss werden die Präparate einmal mit PBS- Puffer und einmal mit *a. bidest* gewaschen und in Mowiol- Lösung eingedeckt.

Die Auswertung sowohl der EGFP- Autofluoreszenz als auch der indirekten Immunfluoreszenz erfolgt mit einem Mikroskop mit Epifluoreszenz- und Kameraausrüstung (Fluoreszenz- Mikroskop Axioplan, Zeiss, Kamera: Spot Camera, Diagnostic Instruments, Michigan, USA).

PBS- Puffer siehe 5.11

Paraformaldehydlösung

Paraformaldehyd 3 % (w/v)

PBS- Puffer

BSA- Puffer (pH 7,4)

BSA 3 % (w/v)

NaCl 200 mM

NaN₃ 0,02 % (w/v)

PBS- Puffer

Triton X100 (0,02 %)

Triton X100 0,02 % (w/v)

PBS- Puffer

Mowiol- Lösung

Mowiol 40-88 2,4 g

Glycerin 6 g

a. bidest 6 ml

Die Mischung wird 16 Stunden zur Quellung bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 12 ml 200 mM Tris/HCl (pH 8,5) und Erwärmen auf 50 °C werden ungelöste Kristalle durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 4500 rpm sedimentiert (Rotina 48R). Dem klaren Überstand wird 10 %

1,4 Diazobicyklo- [2,2,2]- Oktan (DABCO) als Radikalfänger zugesetzt, um ein schnelles Ausbleichen der Präparate unter dem Mikroskop zu verhindern.

6.3.3 SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS- PAGE)

In der SDS- PAGE (Laemmli, 1970) werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die amphipathischen SDS- Moleküle treten bei Erhitzung mit den Proteinen in Wechselwirkung und führen zu deren Denaturierung, Neutralisierung der Eigenladung und negativen Aufladung, so dass die behandelten Proteine im elektrischen Feld bei geeigneter Vernetzung des Polyacrylamids zum Pluspol wandern, wobei die Laufgeschwindigkeit umgekehrt proportional zur molekularen Masse ist.

Die Auftrennung der Proteine erfolgt in Minigelen (10 cm x 8 cm x 0,75 mm) mit einem 8- 11 %igen Polyacrylamid- Trenngel, das mit einem 3,75 %igem Polyacrylamid- Sammelgel überschichtet wird. Die Proben werden mit 4-fach Probenpuffer versetzt und vor dem Auftragen auf das Gel für 5 min bei 95°C erhitzt. Die Elektrophorese wird zum Sammeln der Probenfront zunächst bei 80 Volt, danach bei 100 Volt durchgeführt, bis die Bromphenolblaufront des Probenpuffers die untere Kante des Gels erreicht hat. Zur Abschätzung der Größe wird ein farbig markierter Molekulargewichtsmarker (Rainbow™- Protein- Molecular- Weight- Marker, Amersham) mit aufgetragen.

Sammelgel

Acrylamid	3,75 % (w/v)
N,N'-Methylenbisacrylamid	0,1 % (w/v)
Tris/HCl, pH 6,8	125 mM
SDS	0,1 % (w/v)
Ammoniumpersulfat	0,04 % (w/v)
TEMED	0,1 % (v/v)

a. bidest

Trenngel

Acrylamid	8 % bzw. 11 % (w/v)
N,N'-Methylenbisacrylamid	0,21 % (w/v)
Tris/HCl, pH 8,8	370 mM
Glycerin	5 % (v/v)
SDS	0,1 % (w/v)
Ammoniumpersulfat	0,1 % (w/v)
TEMED	0,1 % (v/v)

*a. bidest**Elektrophoresepuffer*

Glycin	200 mM
Tris	25 mM
SDS	0,1 % (w/v)

*a. bidest**4x Probenpuffer, denaturierend*

Tris/HCl, pH 6,8	200 mM
β-Mercaptoethanol	4 % (v/v)
SDS	4 % (w/v)
Glycerin	40 % (v/v)
Bromphenolblau	0,01 % (w/v)

*a. bidest*6.3.4 Immunoblot

Der Immunoblot dient zum Nachweis von Proteinen mit einem spezifischen Antikörper auf einer Nitrozellulosemembran.

Zum Transfer der Proteine aus dem SDS- Gel auf eine Nitrozellulosemembran (0,2 µm Porengröße, Schleicher und Schuell, Dassel) wurde das Halbtrockenblot-Verfahren (Kyhse-Andersen, 1984) verwendet.

Dazu werden zwischen zwei Graphit- Plattenelektroden drei in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere (Schleicher und Schuell, Dassel), das Gel, die

Nitrozellulosemembran, drei in Anodenpuffer 2 und drei in Anodenpuffer 1 getränkte Filterpapiere geschichtet. Durch den Transfer für eine Stunde bei einer Stromstärke von $0,8 \text{ A/cm}^2$ Blotfläche werden die Proteine auf die Membran übertragen. Die freien Bindungsstellen auf der Membran werden durch einstündige Inkubation in 10 % Magermilchpulver in PBS/ 0,1 % Tween20 abgesättigt. Nach viermaligem Waschen für 5 Minuten in PBS/ 0,1 % Tween20 erfolgt die Inkubation für 1 Stunde mit dem spezifischen Erstantikörper, der 1:10 in Antikörperpuffer verdünnt wird. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/ 0,1 % Tween20 wird die Membran eine Stunde mit einem Peroxidase- gekoppelten Zweitantikörper inkubiert, der 1: 10000 in Antikörperpuffer verdünnt wird. Nach weiteren drei Waschschritten in PBS/ 0,1 % Tween20 erfolgt der Nachweis der spezifisch angefärbten Proteine mittels einer Chemilumineszenz- Reaktion (ECL). Bei dieser Reaktion katalysiert die Peroxidase des Zweitantikörpers die Oxidation von Luminol und löst dadurch Chemilumineszenz aus. Diese kann mittels eines Röntgenfilms dokumentiert werden. Für die ECL- Reaktion werden das „SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate“ der Firma Pierce gemäss den Angaben des Herstellers sowie BioMax- Röntgenfilme (Kodak) verwendet.

Anodenpuffer 1

Tris/HCl (pH 10,4)	300 mM
Methanol	20 % (v/v)
<i>a. bidest</i>	

Anodenpuffer 2

Tris/HCl (pH 10,4)	25 mM
Methanol	20 % (v/v)
<i>a. bidest</i>	

Kathodenpuffer

Tris/HCl (pH 9,4)	25 mM
Methanol	20 % (v/v)
ϵ - Aminocaprinsäure	40 mM
<i>a. bidest</i>	

PBS/ 0,1 % Tween20

NaCl 137 mM

KCl 2,7 mM

Na₂HPO₄ 6,5 mMKH₂PO₄ 1,5 mM

Tween20 0,1 % (v/v)

*a. bidest**Antikörperpuffer*

Magermilchpulver 10 % (w/v)

PBS/ 0,1 % Tween20

7. Ergebnisse

7.1 Neutralisation der viralen Infektiosität durch gH- spezifische Antikörper

In 73 % der Seren HCMV- positiver Patienten lassen sich neutralisierende Antikörper gegen gH nachweisen, die gegen ein lineares Epitop gerichtet sind. Dieses lineare neutralisierende Epitop des gH ist N- terminal lokalisiert und lässt sich zur Affinitätsreinigung monospezifischer Antikörper nutzen (s. 6.3.1; E. Reis, Diplomarbeit, 1991).

Die bei der hier durchgeführten Affinitätsreinigung (s. 6.3.1) erhaltenen 19 Fraktionen des polyklonalen gH- Antikörpers (pabgH) wurden im Western Blot auf ihre Spezifität getestet. Dazu wurden rekombinant hergestellte Fragmente der Tegumentproteine pp65 (292 AS des C- Terminus) und pp150 (244 AS des C- Terminus) sowie der Glykoproteine B (Antigene Domäne 1) und H (166 AS des N- Terminus) verwendet (Eggers et al., 2001), die in der Mehrzahl der Fälle im Verlauf einer HCMV- Infektion eine Antikörperbildung auslösen (Landini et al., 1990; Landini et al., 1991; Nowak et al., 1991; Kniess et al., 1991; Silvestri et al., 1991; Urban et al., 1992; Bogner et al., 1992). Die Glykoproteine B und H sind dabei Hauptziel der neutralisierenden Antikörperantwort (Baboonian et al., 1989; Britt et al., 1990; Kropff et al., 1993; Spaete et al., 1994; Urban et al., 1996; Reschke et al., 1999), wohingegen die Tegumentproteine pp65 und pp150 als antigen, jedoch nicht als Träger neutralisierender Epitope beschrieben wurden (Jahn et al., 1987; Landini & La Placa, 1991; Vornhagen et al., 1994; Schoppel et al., 1997).

Diese Proteinfragmente wurden in einem 11 %igen SDS- Gel aufgetrennt und der Blot wie unter 6.3.4 beschrieben durchgeführt. Als Kontrolle wurde das Patientenserum verwendet, aus dem der pabgH aufgereinigt worden war. Dieses Serum erkannte wie erwartet alle Produkte (Abb. 9). Die Fraktionen 6-14 der Affinitätsreinigung hingegen erwiesen sich als absolut spezifisch und führten zur ausschließlichen Anfärbung des gH- Epitops im Western Blot.

Zur Prüfung der neutralisierenden Eigenschaften wurde ein definiertes Virusinoculum mit unterschiedlichen Verdünnungen des pabgH oder ohne Antikörper als Kontrolle für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und zur Infektion (s. 6.2.3) humaner Fibroblasten (moi 0,05) verwendet. Nach 48 h wurde, wie unter 6.3.2

beschrieben, eine indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis des HCMV- IE-Proteins als Indikator der verbliebenen viralen Infektiosität durchgeführt.

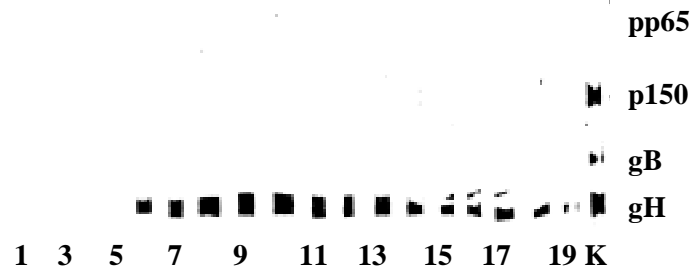


Abbildung 9: Nachweis der Spezifität des pabgH im Immunoblot.

Die Fraktionen 1-19 der Affinitätschromatographie wurden im Western Blot auf Reaktivität mit den Proteinen pp65, pp150, gH und gB untersucht. Als Kontrolle (K) wurde das Patientenvollserum verwendet.

Es zeigte sich, dass das Patientenserum bis zu einer Verdünnung von 1:1 in der Lage war, die eingesetzte Virusmenge vollständig zu neutralisieren. Noch in einer Verdünnung von 1:10 wurde die Zahl der infizierten Zellen stark reduziert. Auch der pabgH führte bei allen getesteten Verdünnungen zu einer deutlichen Reduktion der Anzahl infizierter Zellen (Abb. 10, Tab. 6).

Tabelle 6: Reduktion der Infektiosität durch neutralisierende gH- spezifische Antikörper.

Verdünnung	Reduktion der Infektiosität in %	
	Serum	pabgH
unverdünnt	100 %	87 %
1:1	100 %	60 %
1:10	62 %	35 %

Das Patientenserum erwies sich erwartungsgemäß als stärker neutralisierend, wahrscheinlich aufgrund der neutralisierenden Wirkung von Antikörpern gegen weitere virale Glykoproteine, wie z.B. das Glykoprotein B. Das Ergebnis eines Neutralisationstestes ist verständlicherweise abhängig von den gewählten Bedingungen. Die hier beobachtete relative Neutralisation durch den pabgH zeigte, dass dem gH eine essentielle Funktion bei der Infektion zukommt (Tabelle 6).

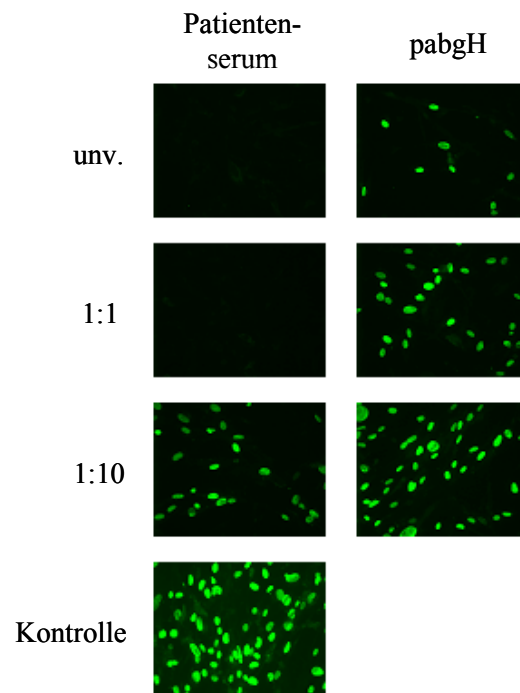


Abbildung 10: Neutralisation der viralen Infektiosität durch pabgH.

Humane Fibroblasten wurden mit einem definierten Virusinokulum (moi 0,05) infiziert, das zuvor für eine Stunde bei 37 °C mit unterschiedlichen Verdünnungen des pabgH bzw. des Patientenserums oder ohne Antikörper als Kontrolle inkubiert worden war. 48 h.p.i wurde die verbliebene Infektiosität mittels Immunfluoreszenz mit anti HCMV- IE bestimmt.

7.2 Herstellung eines HCMV- BAC mit einer funktionellen Deletion des gH-Gens

Untersuchungen zur Eingrenzung funktioneller Domänen eines viralen Proteins sind grundsätzlich durch entsprechende direkte Mutagenese des HCMV- BAC zu erreichen. Dieser experimentelle Ansatz ist arbeits- und zeitaufwendig und darüber hinaus besteht die Gefahr, dass Mutationen in einem essentiellen Gen zu einem letalen viralen Phänotyp führen. Als alternativer experimenteller Ansatz wurde deshalb die Herstellung einer viralen gH- Null- Mutante gewählt, die in trans durch rekombinantes gH- Protein phänotypisch komplementiert werden sollte.

7.2.1 Herstellung des Rekombinationsplasmides pGem11zf-FIA-Kan-FIB

Für die funktionelle Deletion des gH- Gens im HCMV- BAC wurde das Rekombinationsplasmid pGem11zf-FIA-Kan-FIB generiert (Abb. 11; Plasmide siehe 5.15). Eine vollständige Deletion des gH- Gens war nicht angezeigt, da es sich in direkter Nachbarschaft zu dem Gen UL74, welches für das Glykoprotein O kodiert, befindet, dessen Promotorstrukturen nicht beeinträchtigt werden sollten. Daher sollten 846 bp im mittleren Abschnitt des gH- Gens deletiert werden, wozu zunächst mithilfe der PCR die flankierenden Bereiche FIA und FIB amplifiziert wurden. Als Template für diese PCR wurde das Hb15- BAC verwendet. Mit dem Primerpaar FIA1/FIA2 wurde der flankierende Bereich A (FIA), Länge 1827 bp, hergestellt und mit dem Primerpaar FIB1/FIB2 der flankierende Bereich B (FIB), Länge 1614 bp. Der FIA umfasst den 5'- Bereich des gH sowie den angrenzenden Bereich des Virusgenoms, der FIB den 3'- Bereich ebenfalls mit dem angrenzenden Bereich des Virusgenoms. Anschließend wurde der FIA mit EcoRI geschnitten und in den ebenfalls mit EcoRI linearisierten Vektor pGem11zf ligiert. In dieses Zwischenprodukt wurde über die Schnittstellen XhoI und XbaI das ebenso geschnittene FIB- Fragment eingefügt. Schließlich wurde der so veränderte Vektor mit EcoRV „blunt“ geöffnet und das mit SmaI aus dem Vektor pcp15 ausgeschnittene und an den Enden, wie unter 6.1.8 beschrieben, aufgefüllte Kanamycin- Resistenzgen inseriert. Durch geeignete Restriktionsverdau wurde bei allen Zwischenprodukten und dem Endprodukt die korrekte Insertion und Orientierung kontrolliert. Die amplifizierten Bereiche wurden außerdem unter Verwendung der Primer pucgH2, SeqgHre, FIAli1, Flali2, FIAre, FIBre, SeqgHli2, pucgH1, gHinnen1 und Seqfl.Ber.li2 vollständig sequenziert (Oligonukleotide siehe 5.16). Die analysierten Sequenzen enthielten keine Mutationen.

Durch die Klonierungsschritte wurden 846 bp in der Mitte des gH- Gens deletiert und durch das ca. 1480 bp große Kanamycin- Resistenzgen zur Selektion in Bakterien ersetzt. Das gH- Gen war somit funktionell deletiert und das Konstrukt konnte zur Herstellung eines HCMV- BAC mit einer funktionellen Deletion des gH- Gens durch homologe Rekombination benutzt werden.

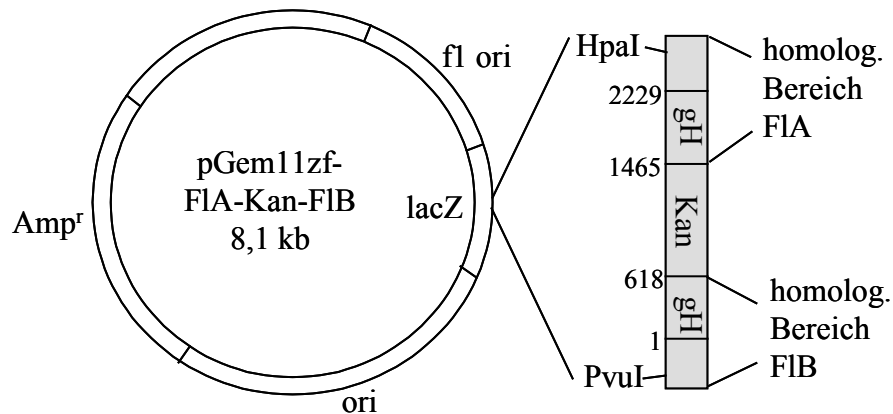


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Herstellung des Rekombinationsplasmids pGem11zf-FLA-Kan-FIB.

Die Herstellung des Konstruktes erfolgte durch Insertion der Rekombinatinskassette in das lacZ-Gen, so dass eine einfache Erkennung der rekombinanten Klone durch Blau-weiß-screening möglich war. Die Rekombinatinskassette enthält die beiden Bereiche FIA und FIB, die jeweils den 5'- bzw. 3'-Bereich von gH sowie die angrenzenden genomischen Bereiche enthalten, sowie das Kanamycin-Resistenzgen.

7.2.2 Herstellung eines replikationsdefizienten HCMV- BACs (HCMV-BAC Δ gHgfp)

Aus dem Rekombinationsplasmid wurde durch Restriktion mit den Enzymen HpaI und PvuI ein 4500 bp langes lineares Fragment ausgeschnitten, welches die beiden flankierenden Bereiche des gH- Gens in geringfügig verkürzter Form, die verbliebenen 5'- bzw. 3'- Bereiche des gH und das inserierte Kanamycin-Resistenzgen enthielt. Dieses Fragment wurde wie unter 6.1.16 beschrieben in die BAC- Mutagenese mit linearen Fragmenten eingesetzt. Das Ausgangs- BAC AD169 Δ US2- 11 (nachfolgend bezeichnet als HCMV- wtBACgfp; Falk et al., 2002) enthält das AD169- Genom ohne den Bereich US2- 11 und außerdem den gfp- Fluoreszenzmarker innerhalb der BAC- Sequenz (Abb. 12). Das Kanamycin-Resistenzgen wurde nicht über die FRT- Sequenzen entfernt. Das entstandene HCMV- BAC Δ gHgfp wurde vergleichend mit dem Ausgangs- BAC durch Restriktion mit den Enzymen BglII, NotI und EcoRI analysiert. Es zeigte sich, dass die BAC- Mutagenese zu dem gewünschten Produkt führte (Daten nicht gezeigt).

Diese Arbeiten wurden von G. Hahn, München, durchgeführt.

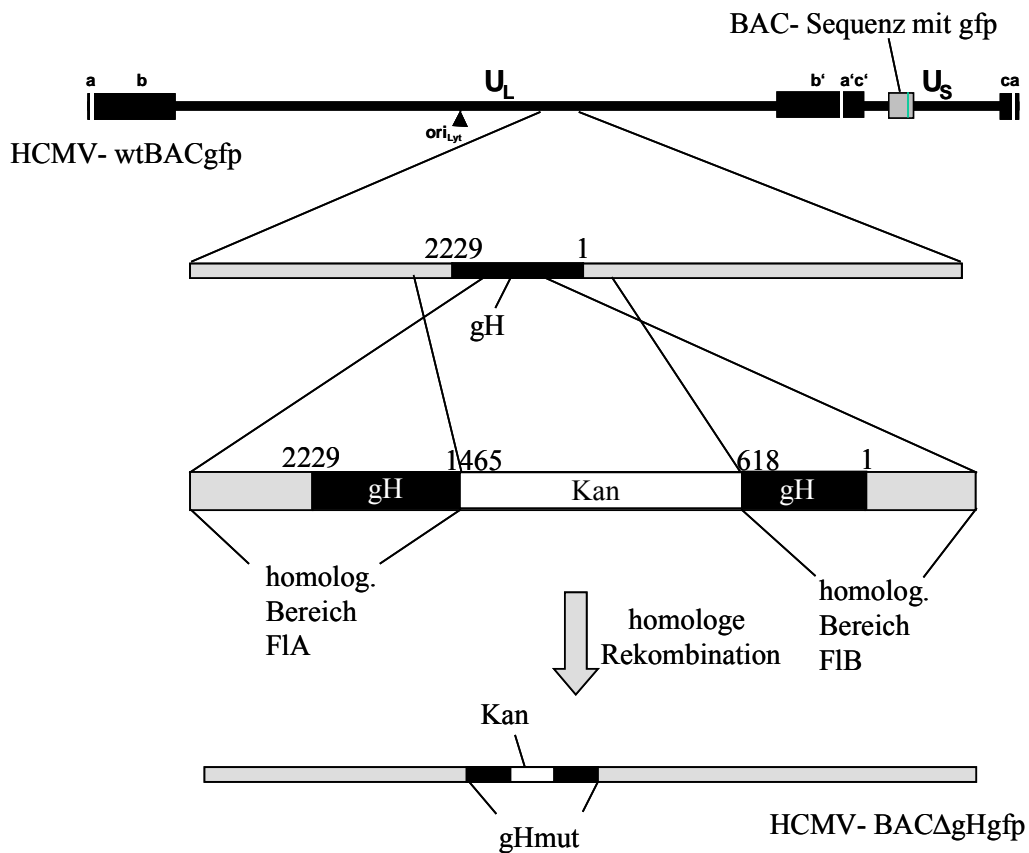


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Herstellung des HCMV- BACΔgHgfp. Erläuterungen siehe Text.

7.2.3 Nachweis der Replikationsdefizienz des HCMV- BACΔgHgfp

Um zu bestätigen, dass es sich bei gH um ein für die Virusvermehrung essentielles Protein handelt, wurde das HCMV- BACΔgHgfp wie unter 6.2.7 beschrieben in humane Fibroblasten transfiziert. Als Kontrolle wurde das HCMV- wtBACgfp transfiziert, welches 7 Tage nach Transfektion erwartungsgemäß zur Ausbildung von grün fluoreszierenden Plaques führte (1-5 Plaques pro 1 µg BAC- DNA; Abb. 13a). Nach Transfektion des HCMV- BACΔgHgfp konnten nur einzelne grüne Zellen nachgewiesen werden (2-20 pro 1 µg BAC- DNA; Abb. 13b), deren Anzahl konstant blieb. Diese Beobachtung zeigte, dass eine Freisetzung infektiöser Virionen nicht stattfand und deshalb die Infektion anderer Zellen der Kultur unterblieb.

Die essentiellen Funktionen des gH-Proteins für die virale Infektiosität und Vermehrung wurden somit bestätigt.

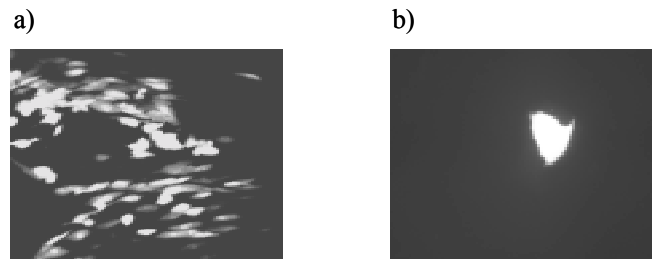


Abbildung 13: Auswirkung der Transfektion humaner Fibroblasten mit HCMV- BAC Δ gHgf bzw. HCMV- wtBACgf.

Humane Fibroblasten wurden mit HCMV- wtBACgf (a) bzw. HCMV- BAC Δ gHgf (b) transfiziert und nach 7 Tagen auf die Entstehung von grün fluoreszierenden Miniplaques bzw. einzelnen grün fluoreszierenden Zellen untersucht (mikroskopische Vergrößerung: a) 200x; b) 400x).

7.3 Phänotypische Komplementation des HCMV- BAC Δ gHgf

Da es sich bei dem deletierten gH um ein essentielles Protein handelt, war im Hinblick auf die Fragestellung eine phänotypische Komplementation des replikationsdefizienten BACs erforderlich, um infektiöse virale Partikel zu erhalten. Eine phänotypische Komplementation setzt ein für HCMV permissives System voraus, in welchem dem HCMV- BAC Δ gHgf gH in einer bioverfügbaren Form angeboten wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere experimentelle Ansätze der Komplementation untersucht.

7.3.1 Versuche zur Komplementation in stabilen gH- Transfektanten humaner Astrozytomzellen (U373)

Die U373- Zelllinie ist von einem Neuroglia- Tumor abgeleitet und permissiv für eine Infektion mit HCMV. Sie lässt sich für die Herstellung stabiler Transfektanten verwenden (Reis *et al.*, 1993). Eine in einer früheren Arbeit von M. Reschke hergestellte stabile gH- Zelllinie, die authentisches gH exprimiert (Reschke *et al.*, 1999), wurde für Transfektionsversuche mit dem HCMV- BAC Δ gHgf verwendet. Es konnten hierbei jedoch nur einzelne grün fluoreszierende Zellen beobachtet

werden. Eine phänotypische Komplementation, die in diesen Zellen zur Entwicklung von grün fluoreszierenden Plaques geführt hätte, konnte trotz wiederholter Versuche nicht erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Auch nach Pande *et al.* konnte die Komplementation einer letalen Virusmutante nach Transfektion mit HCMV- BACs in diesem System nicht erreicht werden (Pande *et al.*, 2000).

7.3.2 Komplementation unter Verwendung einer immortalisierten Fibroblastenzelllinie

Durch Überexpression des Enzyms Telomerase können humane Fibroblasten immortalisiert werden (Bodnar *et al.*, 1998, Bresnahan *et al.*, 2000). In stabil transfizierten Klonen dieser Zellen konnte eine attenuierte Virusmutante des humanen Cytomegalievirus mit einem Defekt in dem regulatorischen Protein pp71 (ppUL82) erfolgreich komplementiert werden (Bresnahan *et al.*, 2000). Diese Zelllinie wurde mit dem gH- Expressionsplasmid pRC/CMVgH transfiziert, auf dem sich zusätzlich ein Geneticin- Resistenzgen befindet. Nach Selektion mittels Geneticin entwickelten sich geneticinresistente Klone, in denen sich jedoch in der Immunfluoreszenz (s. 6.3.2) unter Verwendung des pabgH kein gH nachweisen ließ (Daten nicht gezeigt). Auch dieses System konnte daher nicht für die Komplementation des HCMV- BAC Δ gHgf verwendet werden.

7.3.3 Versuche zur Komplementation unter Verwendung eines Retrovirusystems

Ein anderer Ansatz zur Herstellung komplementierender Zellen ist die Verwendung von Retro- Helferviren, die das Gen für das zu komplementierende Protein tragen und ihre genetische Information nach Infektion in das Genom permissiver Fibroblasten integrieren können. In selektionierten Fibroblasten sollte dann das gewünschte Protein für die Komplementation zur Verfügung stehen.

Verwendet wurde das RetroX^R- System (Clontech, Heidelberg) mit den retroviralen Vektoren pLNCX und pLXSN, die sich in der Anordnung der multiple cloning site bezüglich des Promotors und des Resistenzgens sowie durch den Promotor selbst unterscheiden (s. Abb. 14). Sie enthalten das Verpackungssignal Ψ , wodurch in der

Retrohelferzelllinie pt67 eine Verpackung in retrovirale Partikel ermöglicht wird. Den Vektoren fehlen die Gene für die Strukturproteine, die retrovirale Polymerase und die Hüllproteine (gag, pol und env), die in der verwendeten Retrohelferzelllinie enthalten sind. Das gH- Gen wurde in diese Retrovirusvektoren kloniert und in die Retrohelferzellen transfiziert (s. 6.2.7). Durch Zugabe des Antibiotikums Geneticin wurden die Zellen selektioniert, die den rekombinanten Retrovirusvektor stabil in ihr Genom integriert hatten. In resistenten Zellklonen sollte die Produktion von retroviralen Partikeln ablaufen, die das gH- Gen stabil in ihr Genom integriert hatten. Diese Zellen wurden anschließend in der Immunfluoreszenz und im Immunoblot unter Verwendung des pabgH auf die Expression des gH untersucht.

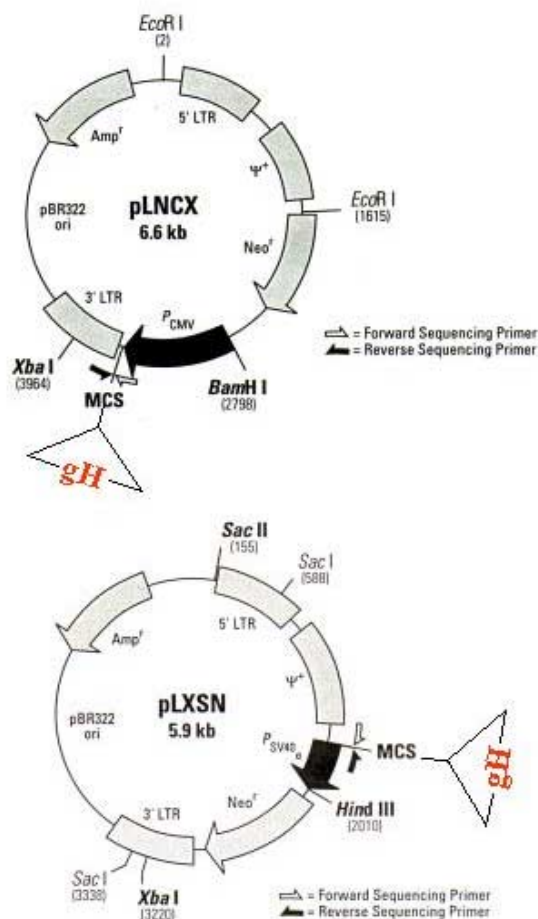


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Retrovirusvektoren pLNCX und pLXSN.

Der Ort der Insertion des gH- Gens und singuläre Restriktionsschnittstellen sind angegeben. Abkürzungen: pBR322ori: origin of replication, Amp^R: Ampicillinresistenzgen, Neo^R: Geneticinresistenzgen, 3'/5' LTR: long terminal repeat (retrovirale Promotoren), p_{CMV}: CMV-immediate early Promotor, P_{SV40}: early SV40- Promotor, MCS: multiple cloning site, ψ : retrovirales Verpackungssignal.

Es zeigte sich bei der Verwendung beider Vektoren, dass nur in wenigen Zellen der Helferzelllinie gH zu finden war (Daten nicht gezeigt). Das Kulturmedium des Ansatzes mit dem Vektor pLXSN wurde außerdem auf NIH3T3- Zellen titriert, um die Menge der freigesetzten retroviralen Partikel zu ermitteln. Diese Zellen sollten nach Infektion mit dem Vektor geneticinresistente Zellklone bilden, die zur Ermittlung des Titers gezählt werden sollten. In den hier durchgeführten Versuchen wurden keine Klone erhalten (Daten nicht gezeigt).

Dennoch wurden die Kulturüberstände der transfizierten Retrohelferzelllinie auf humane Fibroblasten übertragen und nach Geneticin- Behandlung resistente Klone selektioniert. In der mit diesen Zellen durchgeführten Immunfluoreszenz (s. 6.3.2) sowie im Immunoblot (s. 6.3.4) war jedoch kein gH nachweisbar (Daten nicht gezeigt), so dass dieser Ansatz zur Komplementation des HCMV- BAC Δ gHgfp nicht weiter verfolgt wurde.

7.3.4 Komplementation unter Verwendung von adenoviralen Helferviren

Als weiteres System zur Komplementation bietet sich das Adenovirussystem an, da auch durch diese Viren das gH- Gen in Fibroblasten eingebracht und exprimiert werden kann. Das gewünschte Gen kann in adenovirale Vektoren, die defizient sind für die Proteine E1 (AdgfpI; He et al., 1998), E4 (Ad366; Halbert et al., 1985) oder E1 und E4 (AdgfpII; He et al., 1998) inkloniert werden. Die hier verwendeten Vektoren enthalten außerdem das gfp- Markergen. Nach Transfektion in komplementierende Zelllinien (die 293- Zelllinie für AdgfpI und die 911E4- Zelllinie für AdgfpII sowie Ad366 (He et al., 1998)), die die entsprechenden Proteine exprimieren, entstehen adenovirale Partikel. Diese sind eigenen Experimenten zufolge in der Lage, humane Fibroblasten zu infizieren. Sie sollten sich darin jedoch aufgrund der fehlenden Genregionen nicht vermehren, jedoch zur Expression des gewünschten Proteins führen. Diese Eigenschaften waren Voraussetzung für die Verwendung dieser viralen Partikel als Helferviren.

Die Proteine der E1- Region beeinflussen den Zellzyklus und fungieren als Transkriptionsaktivatoren. Die E4- Region codiert für einige regulatorische Proteine, die unterschiedliche Funktionen beim Spleißen und dem Transport früher und später

mRNAs, bei der DNA- Replikation und dem Virusassembly haben (Shenk, 1996). Aufgrund von Hinweisen in der Literatur bestand die Vermutung, dass replikationsdefizientes Adenovirus durch frühe HCMV- Produkte, die auch nach Transfektion mit dem HCMV- BAC Δ gHgf entstehen, komplementiert werden kann (Tevethia et al., 1987). Es sollte daher in Vorversuchen der Effekt einer HCMV- Überinfektion auf replikationsdefizientes Adenovirus überprüft werden.

Dazu wurden humane Fibroblasten in zwei Parallel- Kulturen nur mit replikationsdefizienten adenoviralen Partikeln infiziert (moi 10) bzw. gleichzeitig mit dem HCMVwt- Stamm AD169 wie unter 6.2.3 beschrieben überinfiziert (moi 0,1). Nach 72 h wurden die Zellen geerntet und die adenoviralen Partikel durch drei Zyklen von Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen aus den Zellen freigesetzt. Es folgte die Titration der adenoviralen Partikel in den Helferzellen. Zur Auswertung der Titration wurde die adenovirale Polymerase E2A 24 h.p.i. mit dem spezifischen Antikörper B6-6 (J. Flint, Princeton) in der Immunfluoreszenz nachgewiesen. Bei der Auswertung lagen die Titer nach HCMV- Überinfektion um 1- 3 Größenordnungen höher als bei den vergleichbaren Ansätzen ohne HCMV- Überinfektion (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis zeigte somit, dass eine Komplementation der adenoviralen Partikel durch eine HCMV- Überinfektion stattfinden konnte und diese Strategie zur Komplementation des HCMV- BAC Δ gHgf ungeeignet war.

7.3.5 Phänotypische Komplementation durch transiente Expression von authentischem gH

Um zu überprüfen, ob durch transiente Expression von authentischem gH eine Komplementation erzielt werden kann, wurde ein geeignetes gH- Plasmid mit der DNA des replikationsdefizienten HCMV- BAC Δ gHgf wie unter 6.2.8 beschrieben in permissive humane Fibroblasten kotransfiziert. Als Kontrolle wurde sowohl das HCMV- BAC Δ gHgf als auch das gH- Expressionsplasmid allein transfiziert (s. 6.2.7). 48 h nach Transfektion wurde eines der vier Deckgläschen jedes Ansatzes wie unter 6.3.2 beschrieben in einer indirekten Immunfluoreszenz auf die Expression des HCMV- *immediately early* Antigens (IE) hin untersucht, um die Effizienz der

Transfektion zu bestimmen (Daten nicht gezeigt). Die Entstehung von grün fluoreszierenden Miniplaques wurde im Fluoreszenzmikroskop direkt untersucht.

Bei den Zellen, die nur mit dem HCMV- BAC Δ gHgf_{fp} transfiziert wurden, kam es zur Entstehung einzelner grüner Zellen, nicht jedoch zur Bildung von Miniplaques (Abb. 15 a). Die Anzahl dieser grünen Einzelzellen lag bei mehrmaligen Wiederholungen des Experiments je nach Zustand der Zellen und Qualität der DNA zwischen 2 und 20 pro 1 μ g BAC- DNA. Grün fluoreszierende Miniplaques wurden reproduzierbar bei den Zellen beobachtet, die mit dem HCMV- BAC Δ gHgf_{fp} und dem gH- Expressionsplasmid kotransfiziert wurden (Abb. 15 b). Hier ergaben sich bei mehreren Wiederholungen zwischen 1 und 5 Miniplaques pro 1 μ g BAC- DNA. Bei den Zellen, die nur das gH- Expressionsplasmid erhalten hatten, ergab sich, wie erwartet, keine Fluoreszenz (Abb. 15 c).

Die beobachteten Miniplaques degenerierten nach etwa drei Wochen (Abb. 15 d). Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass eine homologe Rekombination zwischen dem HCMV- BAC Δ gHgf_{fp} und dem gH- Expressionskonstrukt nicht stattgefunden hatte. In diesem Fall hätten sich ausbreitende grün fluoreszierende Plaques beobachtet werden müssen als Hinweis auf eine replikationskompetente Revertante, die phänotypisch und genetisch nicht von dem HCMV- wtBACg_{fp} zu unterscheiden sein sollte.

Transient exprimiertes authentisches gH ist somit in der Lage, das HCMV- BAC Δ gHgf_{fp} in kotransfizierten Zellen für einen Replikationszyklus phänotypisch zu komplementieren. Dadurch war die Voraussetzung für die Untersuchungen zur Eingrenzung funktioneller Domänen des gH unter Verwendung dieses experimentellen Ansatzes gegeben.

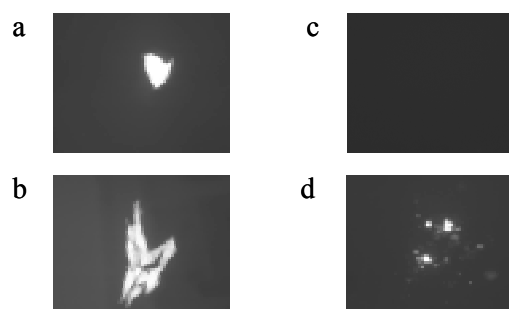


Abbildung 15: Phänotypische Komplementation des HCMV- BAC Δ gHgf_{fp} durch Koexpression von authentischem gH.

a) solitäre Transfektion des HCMV- BAC Δ gHgf_{fp}; b) Kotransfektion des HCMV- BAC Δ gHgf_{fp} mit einem gHwt- Expressionskonstrukt; c) solitäre Transfektion des gHwt- Expressionskonstruktes d)

nach Kotransfektion des HCMV- BAC Δ gHgf mit einem gHwt- Expressionskonstrukt entstandener Plaque nach etwa drei Wochen (mikroskopische Vergrößerung: 200x bei Einzelzellen, 400x bei Plaques).

7.4 Herstellung von Expressionsplasmiden mit gezielten Mutationen im gH- Gen

Zur Eingrenzung funktioneller Domänen des gH wurden verschiedene gH- Expressionsplasmide mit gezielten Mutationen im gH- Gen hergestellt. Diese wurden durch Mutagenisierung des gH- Gens im Vektor pRC/CMVgH (M. Reschke, Diplomarbeit, 1990) erhalten.

Zunächst wurden zwei Plasmide hergestellt, in denen der für die Transmembrandomäne (TM; gH Δ TM) codierende Bereich (19 AS) bzw. der für das Signalpeptid (SP; gH Δ SP) codierende Bereich (18 AS) des gH- Gens mithilfe der rekombinanten PCR deletiert wurde. Die Deletion des SP diente als Negativkontrolle; hier wurde erwartet, dass dieses mutagenisierte gH nicht in der Lage ist, das HCMV- BAC Δ gHgf zu komplementieren.

7.4.1 Deletion der Transmembrandomäne

Zunächst wurden für die Deletion der TM mithilfe der rekombinanten PCR, wie unter 6.1.14 beschrieben, zwei den zu deletierenden Bereich flankierende Fragmente hergestellt. Der 5'- Bereich der TM wurde mittels der Primer RPCR8b und RPCR13 amplifiziert, der 3'- Bereich mittels der Primer RPCR7 und RPCR9b (Abb. 16). Die Oligonukleotide RPCR8b und RPCR9b enthalten an ihrem 5'- Ende einen überhängenden Bereich von 12 bp (RPCR9b) bzw. 10 bp (RPCR8b) Länge, der komplementär zum jeweils anderen Oligonukleotid ist, so dass beide Amplifikate über einen Abschnitt von 22 bp homolog zueinander sind. Es folgte ein DpnI- Verdau zur Entfernung der parentalen DNA. In einer dritten PCR- Reaktion mit den beiden Amplifikaten der ersten beiden Reaktionen als Template und den äußeren Oligonukleotiden RPCR7 und RPCR13 wurde ein Fragment erhalten, welches noch das gH- Startcodon und die für den C- Terminus codierende Region, nicht jedoch den für die TM codierenden Abschnitt trug. Das Fragment wurde über die Schnittstellen EcoRI und PshAI in den parentalen Vektor pRC/CMVgH kloniert und

somit das Expressionskonstrukt gH Δ TM generiert. Die Insertion wurde mittels Restriktionsendonukleaseverdau (s. 6.1.4) und analytischer Gelelektrophorese (s. 6.1.5) nachgewiesen und der durch rekombinante PCR generierte Abschnitt vollständig unter Verwendung der Oligonukleotide gHli2, RPCR3, gHinnen1, gHinnen 3, FlA2 und SeqgHre sequenziert. Es wurden keine unerwünschten Mutationen gefunden.

7.4.2 Deletion des Signalpeptides

Zur Deletion des SP des gH wurden mit den Oligonukleotiden RPCR1 und RPCR2 der Bereich stromaufwärts des gH- Gens, mit den Oligonukleotiden RPCR3 und SeqgHli2 der stromabwärts gelegene Bereich amplifiziert (Abb. 17). Der homologe Bereich der Produkte erstreckte sich über 24 bp. Es folgte eine DpnI- Restriktion zur Entfernung der parentalen DNA. In der dritten PCR wurden die Primer RPCR2 und SeqgHli2 eingesetzt, wobei die Produkte aus den ersten beiden PCR- Reaktionen als Template dienten. Das Fragment wurde über die Schnittstellen Eco47III und HindIII in den parentalen Vektor pRC/CMVgH kloniert und somit das Expressionskonstrukt gH Δ SP generiert. Auch hier erfolgte eine Überprüfung des Produktes mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung mithilfe der Oligonukleotide gHli2, RPCR 3, gHinnen1, gHinnen3, FlA2 und SeqgHre. Es waren keine Mutationen vorhanden.

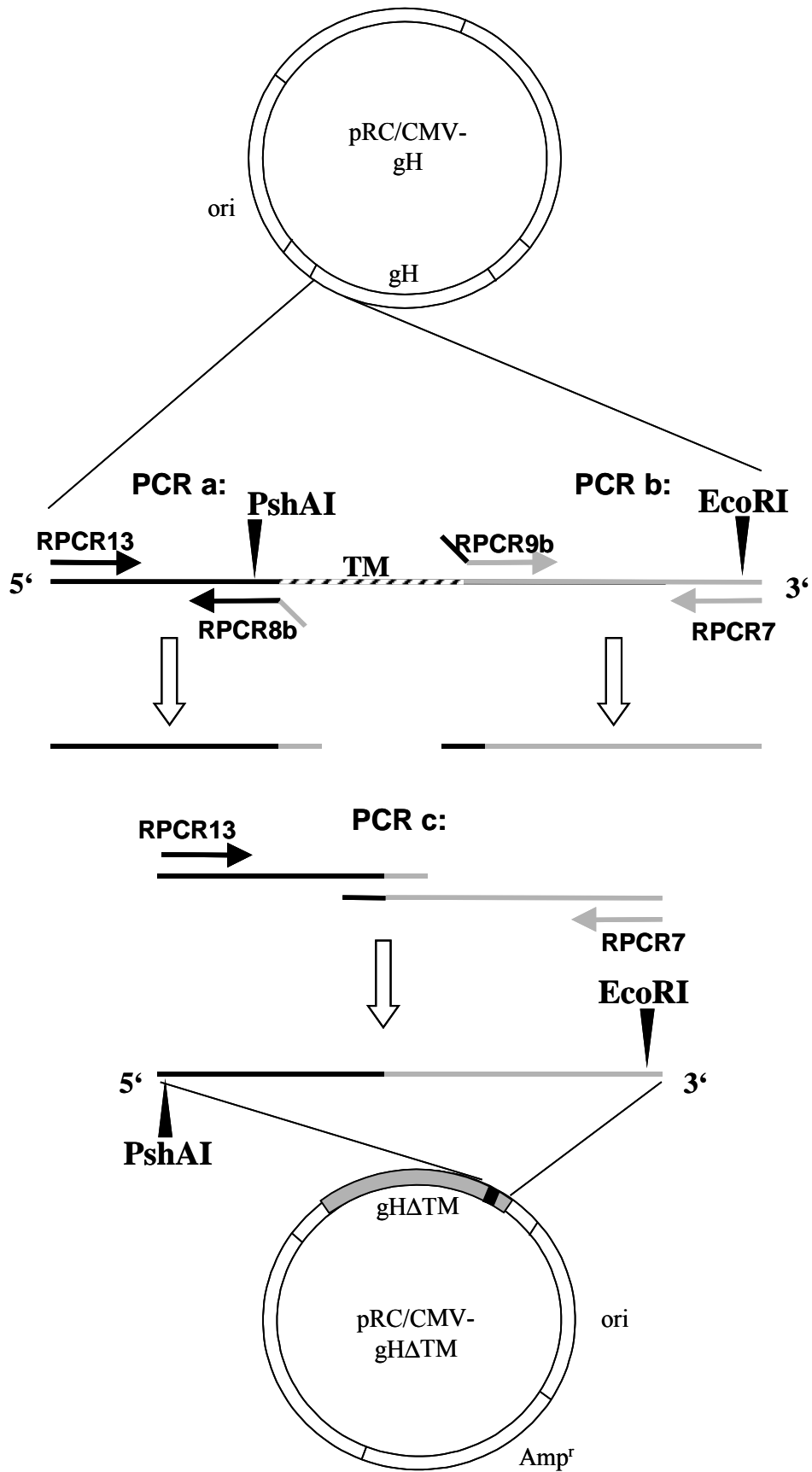


Abbildung 16: Schema der Herstellung des Konstruktes $gH\Delta TM$. Erläuterungen siehe Text.

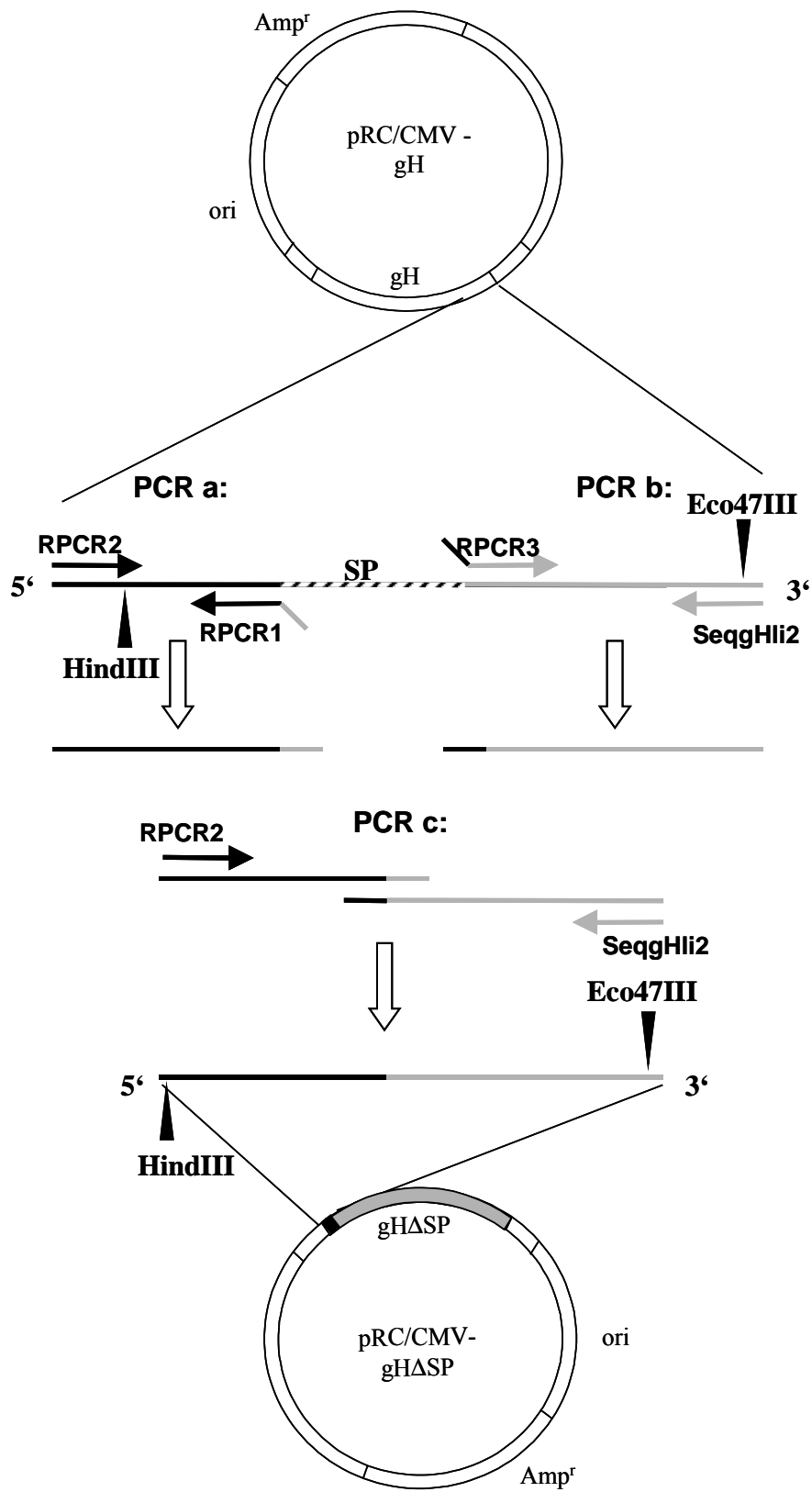


Abbildung 17: Schema der Herstellung des Konstruktes $gH\Delta SP$. Erläuterungen siehe Text.

7.4.3 Deletionen innerhalb des gH- Gens

Mithilfe des Exo Mung Bean Deletion Kit (s. 6.1.15) wurden weitere Deletionen im luminalen, an die TM anschließenden Abschnitt hergestellt. Dazu wurden zunächst wie unter 6.1.14 beschrieben mittels der rekombinanten PCR die benötigten neuen Schnittstellen NheI und PshAI in den Ausgangsvektor pRC/CMVgH eingeführt (s. Abb. 18). Verwendet wurden für die erste PCR die Oligonukleotide RPCR4 und RPCR11, für die zweite die Oligonukleotide RPCR10c und RPCR5c. Die Oligonukleotide RPCR11 und RPCR10c sind komplementär zueinander und enthalten die neuen Schnittstellen. Es folgte eine DpnI- Restriktion zur Entfernung der parentalen DNA. Die dritte PCR wurde mit den Oligonukleotiden RPCR12 und RPCR4 durchgeführt. Die Plasmid- DNA aus transformierten Bakterienklonen wurde mittels Restriktion mit den Restriktionsendonukleasen NheI und PshAI und Agarosegelelektrophorese (s. 6.1.5) untersucht. Anschließend wurde unter Verwendung der Oligonukleotide pucgH2, SeqgHre, FlAre, gHinnen3, RPCR3 und SeqgHli2 sequenziert. Es wurden keine Mutationen gefunden.

Es folgte eine Restriktion mittels des Restriktionsenzym Agel und eine Auffüllreaktion mit Deoxythionukleotiden mithilfe der Klenow- Polymerase, um den Vektoranteil im nachfolgenden Schritt vor Restriktion durch die Exonuklease III zu schützen. Anschließend folgte eine weitere Restriktion mit dem Enzym XbaI, um einen 5'- Überhang zu erzeugen, der als Angriffspunkt für die Exonuklease III dient (s. Abb. 18). Die Inkubationstemperatur der nachfolgenden Exonuclease III- Restriktion betrug 23 °C, die Inkubationszeiten betragen 3, 6, 9, 12 und 15 Minuten. Die Geschwindigkeit der Exonuclease III beträgt bei dieser Temperatur etwa 125 bp/min. Die einzelnen Ansätze wurden für 15 min auf 68 °C erhitzt, um die Exonuclease III zu inaktivieren, 30 Minuten bei 30 °C mit Mung Bean Nuclease inkubiert, um überhängende Einzelstränge abzudauen, und dann blunt religiert. Nach Transformation in Epicurian Coli JM109- Zellen und Ausplattieren auf LB- Platten, die mit Ampicillin (100 µg/ml) versetzt sind, wurden Klone erhalten.

Die DNA der Konstrukte wurde isoliert und mittels Restriktionsverdau (EcoRI/PshAI) sowie Sequenzierung unter Verwendung des Oligonukleotides RPCR5b auf die genaue Größe der Deletion hin untersucht. Weiterhin wurde die Einhaltung des Leserasters überprüft.

Es wurden drei Klone erhalten (gH Δ aa 609-701, gH Δ aa 505-701, gH Δ aa 306-701), die weiterverwendet werden konnten. Die Deletionen betragen 279 bp, 591 bp und 1188 bp.

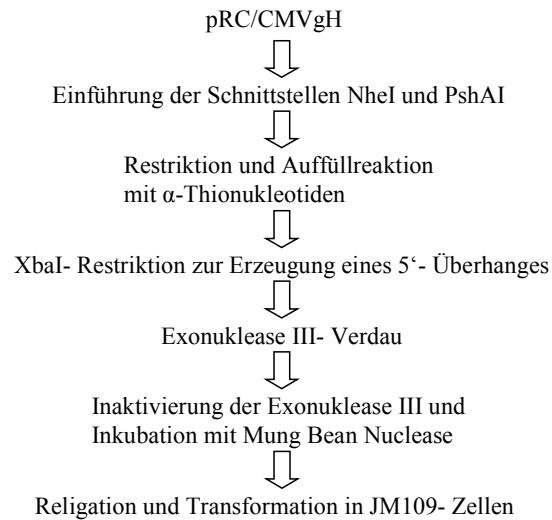


Abbildung 18: Übersicht über die Vorgehensweise zur Mutagenese mittels des Exo Mung Bean Deletion Kit. Erläuterungen siehe Text.

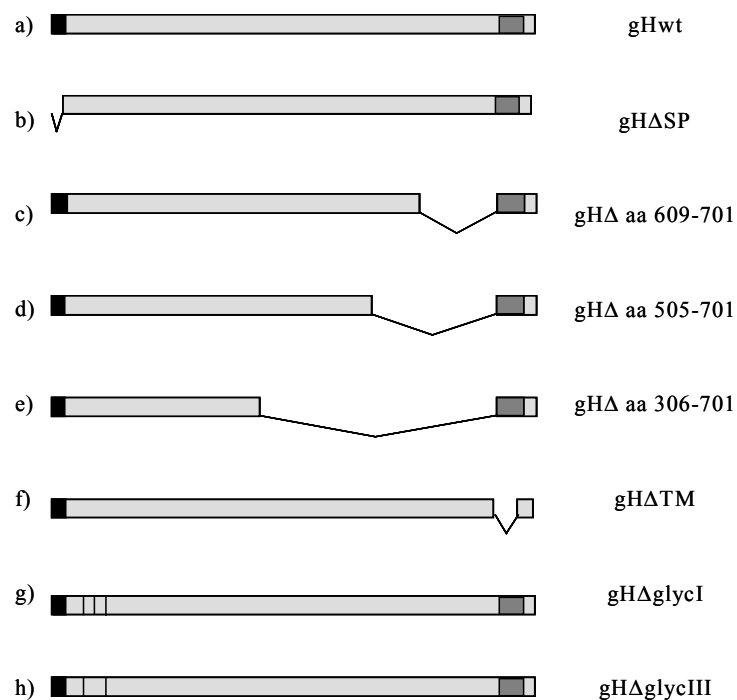


Abbildung 19: Zusammenfassende Darstellung der in das gH- Gen eingeführten Mutationen. a)wtgH; b) Deletion des SP; c) Deletion der aa 609-701; d) Deletion der aa 505-701; e) Deletion der aa 306-701; f) Deletion der TM; g) Deletion der Glykosylierungsstellen im Bereich der AS 56-58, 63-65 und 68-71 (gH Δ glycI); h) Deletion der Glykosylierungsstellen im Bereich der AS 56-58 und 68-71 (gH Δ glycIII).

7.4.4 Mutation von potentiellen Glykosylierungsstellen des gH- Proteins

Bereits vorhanden waren die gH- Expressionsplasmide mit Deletionen der Glykosylierungsstellen im Bereich der AS 56-58, 63-65 und 68-71 (gH Δ glycI) bzw. 56-58 und 68-71 (gH Δ glycIII, s. Abb. 19), die von M. Reschke generiert wurden (M. Reschke, Doktorarbeit, 1995).

7.4.5 Überprüfung der Expression der mutagenisierten gH- Expressionsplasmide

Zur Überprüfung der Expression und der intrazellulären Lokalisation der mutagenisierten gH- Proteine wurden die in Abbildung 19 dargestellten Konstrukte mittels Lipofektin- Transfektion wie unter 6.2.6 beschrieben in COS7- Zellen transfiziert. Als Kontrolle diente das Plasmid pRC/CMVgH, welches das gHwt- Gen trägt. Der Nachweis der Expression der gH- Proteine erfolgte, wie unter 6.3.2 beschrieben, mittels indirekter Immunfluoreszenz. Dazu wurden die Zellen 48 h nach Transfektion unter Verwendung des pabgH auf gH- spezifische Fluoreszenz untersucht. Es zeigte sich, dass in allen Ansätzen spezifische gH- Fluoreszenz zu detektieren war (Abb. 20). Die subzelluläre Verteilung der mutagenisierten gH- Proteine war in allen Fällen vergleichbar mit der des gHwt.

Die Plasmide waren somit funktionell und konnten für die anschließenden Untersuchungen verwendet werden.

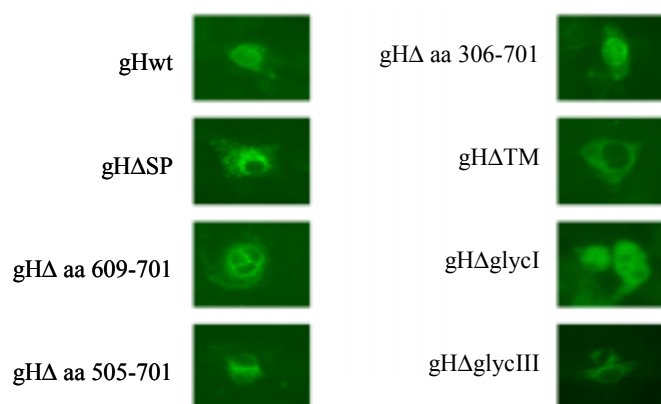


Abbildung 20: Nachweis der Expression der mutagenisierten gH- Proteine in COS7- Zellen. Nach Transfektion der in Abbildung 19 dargestellten mutagenisierten gH- Expressionsplasmide in COS7- Zellen wurde durch indirekte Immunfluoreszenz mit dem monospezifischen pabgH die Expression und die subzelluläre Verteilung kontrolliert (Vergrößerung 400x).

7.4.6 Komplementation des HCMV- BAC Δ gHgfp durch Koexpression von mutagenisiertem gH- Protein

Um zu prüfen, ob die in das gH- Protein eingeführten Mutationen für die Virusvermehrung essentielle Bereiche betreffen, wurden wie unter 6.2.8 beschrieben Kotransfektionen von HCMV- BAC Δ gHgfp mit den gH- Expressionsplasmiden in humanen Fibroblasten durchgeführt.

Es zeigte sich, dass die Deletion sowohl der TM als auch die des SP die Virusvermehrung verhinderte. Nach der Kotransfektion waren nur einzelne grüne Zellen zu beobachten (Abb. 21 d, e). Demgegenüber stellte die Deletion der AS 609 bis 701 keine für die Virusvermehrung essentielle Veränderung dar, denn etwa 7 Tage nach der Kotransfektion zeigten sich grün fluoreszierende Miniplaques (Abb. 21 c). Diese Miniplaques degenerierten nach etwa drei Wochen. Die Deletion der AS 505 bis 701 bzw. 306 bis 701 hingegen verhinderte eine Ausbildung von Miniplaques. Hier waren nur einzelne grüne Zellen zu beobachten (Abb. 21 f, g). Die Deletion der Glykosylierungsstellen im Bereich der AS 56-58, 63-65 und 68-71 (gH Δ glycI) bzw. AS 56-58 und 68-71 (gH Δ glycIII) hatte wiederum keine Auswirkung auf die Miniplaquebildung (Abb. 21 a, b). Als Positivkontrolle wurden Kotransfektionen mit einem das wtgH- exprimierenden Plasmid durchgeführt. Hier entwickelten sich wie erwartet Miniplaques (Abb. 21 h).

Auch diese Experimente wurden wiederholt durchgeführt. Es ergaben sich hierbei je nach Zustand der Zellen 1- 20 grün fluoreszierende Einzelzellen bzw. 1- 5 grün fluoreszierende Miniplaques pro 1 μ g eingesetzter BAC- DNA.

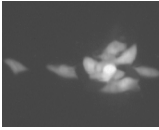

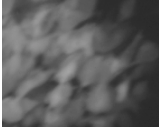

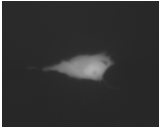
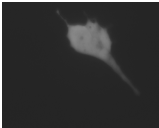
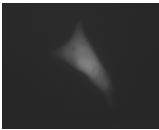
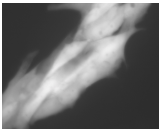
		Miniplaquebildung
a) gHΔglycI		+
b) gHΔglycIII		+
c) gHΔ aa 609-701		+
d) gHΔTM		-
e) gHΔSP		-
f) gHΔaa 505-701		-
g) gHΔaa 306-701		-
h) gHwt		+

Abbildung 21: Phänotypische Komplementation des HCMV- BACΔgHgfp durch Koexpression von mutagenisiertem gH. Nach Kotransfektion des HCMV- BACΔgHgfp mit den mutagenisierten gH-Proteinen wurde die Entwicklung von grün fluoreszierenden Einzelzellen bzw. Miniplaques untersucht (Vergrößerung 200x bei a, b, c und h; 400x bei d, e, f, und g).

7.4.7 Übertrag infektiöser viraler Partikel

Die Entstehung von Miniplaques nach Kotransfektion von HCMV- BACΔgHgfp und den entsprechenden gH- Expressionskonstrukten impliziert die Entstehung infektiöser viraler Partikel in kotransfizierten Zellen. Da neben Miniplaques in den Kulturschalen auch einzelne grün fluoreszierende Zellen entstanden, war

anzunehmen, dass infektiöse virale Partikel nicht nur direkt von kotransfizierten Zellen zu Nachbarzellen übertragen wurden, sondern dass diese Partikel auch in das Kulturmedium freigesetzt wurden.

Um diese Annahme zu bestätigen, wurde das Kulturmedium von Ansätzen, in denen sich Miniplaques entwickelten, auf frische Fibroblastenkulturen übertragen. Nach 3-4 Tagen waren in diesen Kulturen in der Tat einzelne grün fluoreszierende Zellen zu beobachten, die sich erwartungsgemäß nicht zu Miniplaques weiterentwickelten (Abb. 22).

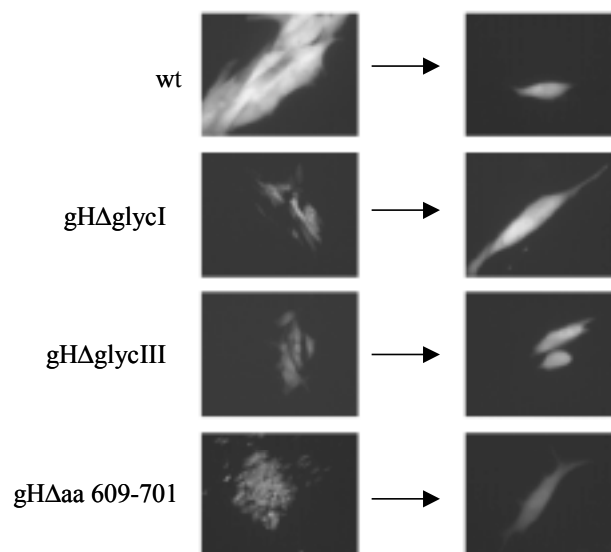


Abbildung 22: Nachweis der Freisetzung phänotypisch komplementierten Virus aus Miniplaques
Das Kulturmedium von Kotransfektionsansätzen von HCMV- BAC Δ gHgfp und mutanten gH- Expressionskonstrukten, die eine Virusreplikation für eine Runde zuließen, wurde nach der Entwicklung der Miniplaques auf frische Fibroblasten übertragen. 3-4 Tage nach dem Übertrag wurden die Kulturen am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die linke Bildreihe zeigt die Plaques, die rechte die grün fluoreszierenden Einzelzellen nach dem Übertrag. (Mikroskopische Vergrößerung: Plaques 200x, Einzelzellen 400x).

7.4.8 Nachweis von gH- und IE- Protein in grün fluoreszierenden Miniplaques

Aus theoretischer Sicht sollte bei den nach Kotransfektion entstehenden grün fluoreszierenden Miniplaques nur in einer Zelle das gH- Protein nachweisbar sein, nämlich in der primär kotransfizierten Zelle, in der aufgrund der phänotypischen Komplementation durch gH die Virusreifung vollständig stattfinden konnte. Die nachfolgend infizierten Zellen sollten abortiv infiziert und daher frei von gH sein.

Hingegen sollte in allen Zellen eines Miniplaques das IE- Protein nachzuweisen sein, da es auch in abortiv infizierten Zellen exprimiert wird.

Um diese Annahme zu verifizieren, wurden die Miniplaques, die nach der Kotransfektion von HCMV- BAC Δ gHgfp und den Konstrukten gHwt, gH Δ glycI, gH Δ glycIII und gH Δ aa 609-701 entstanden waren, wie unter 6.3.2 beschrieben, in der indirekten Immunfluoreszenz unter Verwendung des pabgH und des monoklonalen IE- Antikörpers auf gH- und IE- Expression untersucht.

Wie erwartet konnte in allen Zellen eines Miniplaques das IE- Protein nachgewiesen werden, wohingegen nur in jeweils einer Zelle eines Plaques das gH- Protein nachgewiesen werden konnte (Abb. 23 a und b).

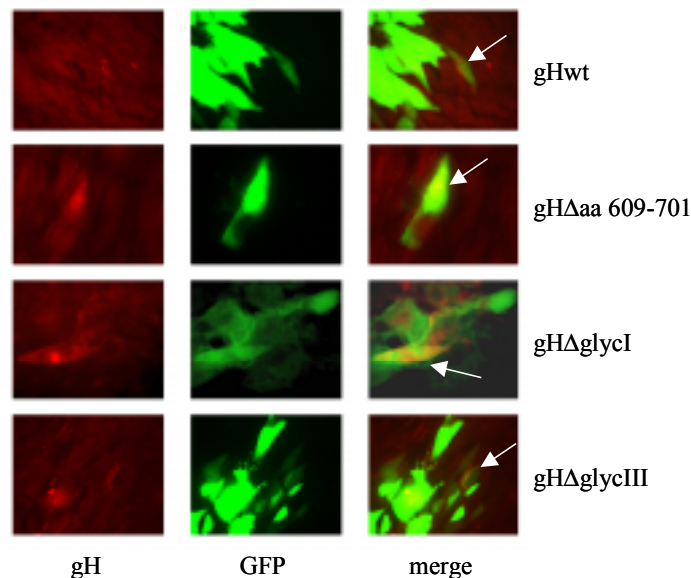


Abbildung 23 a): Fluoreszenzimmunologischer Nachweis von gH in grün fluoreszierenden Miniplaques.

Die nach der Kotransfektion des HCMV- BAC Δ gHgfp und der gH- Konstrukte gHwt, gH Δ glycI, gH Δ glycIII und gH Δ aa 609-701 erhaltenen Miniplaques wurden in der indirekten Immunfluoreszenz, wie unter 6.3.2 beschrieben, unter Verwendung des pabgH auf gH- exprimierende Zellen untersucht (mikroskopische Vergrößerung 200x).

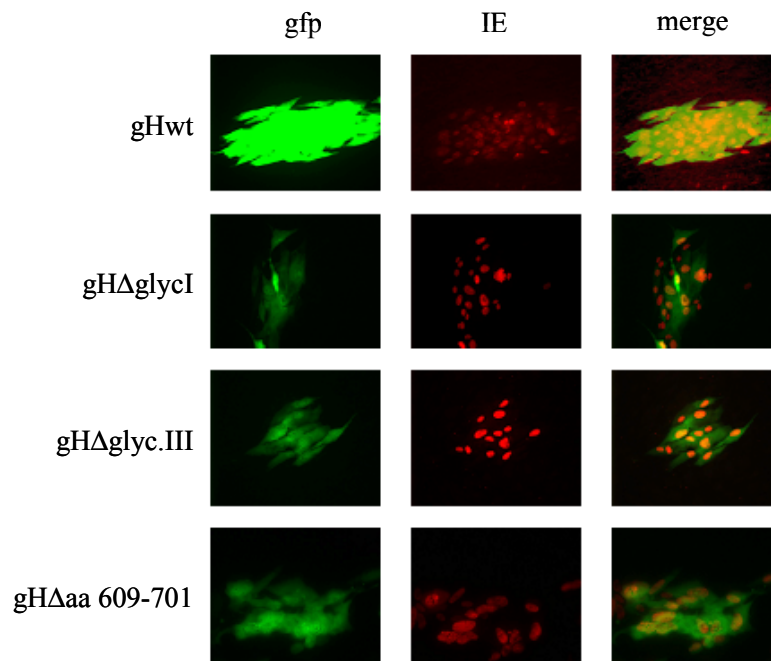


Abbildung 23 b): Fluoreszenzimmunologischer Nachweis von IE in grün fluoreszierenden Miniplaques.

Die nach der Kotransfektion des HCMV- BAC Δ gHgfp und der gH- Konstrukte gHwt, gH Δ glyc.I, gH Δ glyc.III und gH Δ aa 609-701 erhaltenen Miniplaques wurden in der indirekten Immunfluoreszenz, wie unter 6.3.2 beschrieben, unter Verwendung des anti- HCMV- IE Antikörper auf die Expression des IE- Proteins untersucht (mikroskopische Vergrößerung 200x).

7.4.9 Nachweis von gH in grün fluoreszierenden Einzelzellen

Die Entwicklung von lediglich einzelnen grünen Zellen bei einigen der Kotransfektionsansätze mit dem HCMV- BAC Δ gHgfp und den mutagenisierten gH- Expressionskonstrukten könnte theoretisch darauf zurückzuführen sein, dass das Ereignis einer Kotransfektion von HCMV- BAC Δ gHgfp und dem jeweiligen gH- Expressionsplasmid ausgeblieben war. In diesem Falle könnte keine Aussage bezüglich der Funktion des jeweiligen mutagenisierten Bereiches getroffen werden.

Zur Überprüfung dieses Arguments wurde bei jedem der Ansätze, bei denen lediglich einzelne grüne Zellen entstanden waren, eine indirekte Immunfluoreszenz (s. 6.3.2) unter Verwendung des pabgH durchgeführt. In allen Ansätzen, die eine gfp- Einzelzell- Fluoreszenz zeigten, konnte auch das gH- Protein in etwa 50 % dieser Zellen nachgewiesen werden (Abb. 24). Dieses Ergebnis zeigte, dass durch die

Deletionen der TM, des SP, sowie der aa 505-701 und 306-701 für die Virusvermehrung essentielle Strukturen zerstört wurden.

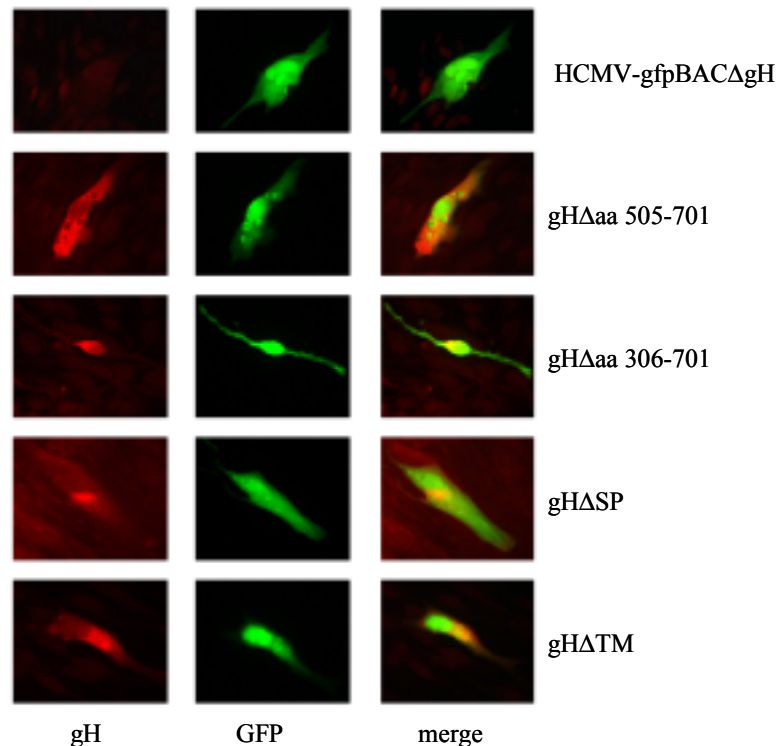


Abbildung 24: Fluoreszenzimmunologischer Nachweis von gH in einzelnen grün fluoreszierenden Zellen.

Die nach Kotransfektion von HCMV- BAC Δ gHgf und den mutierten gH- Plasmiden gH Δ TM, gH Δ SP, gH Δ aa 505-701 und gH Δ aa 306-701, entstandenen einzelnen grünen Zellen wurden in der Immunfluoreszenz wie unter 6.3.2 beschrieben unter Verwendung des pabgH auf die Kolokalisation von gH und gfp hin untersucht (mikroskopische Vergrößerung 400x).

7.4.10 Fluoreszenzimmunologischer Nachweis von gB in grün fluoreszierenden Zellen und Plaques

Um die Expression anderer viraler Proteine in den nach Kotransfektion mit HCMV- BAC Δ gHgf und mutagenisierten gH- Expressionsplasmiden induzierten grün fluoreszierenden Zellen bzw. Plaques zu überprüfen, wurde eine Glykoprotein B-spezifische Immunfluoreszenz durchgeführt. Das gB ist ein Protein der späten β - bzw. γ 1- Phase (Smuda et al., 1997) und sollte auch nach solitärer Transfektion des HCMV- BAC Δ gHgf nachzuweisen sein, ohne dass eine Replikation des Virus stattfindet.

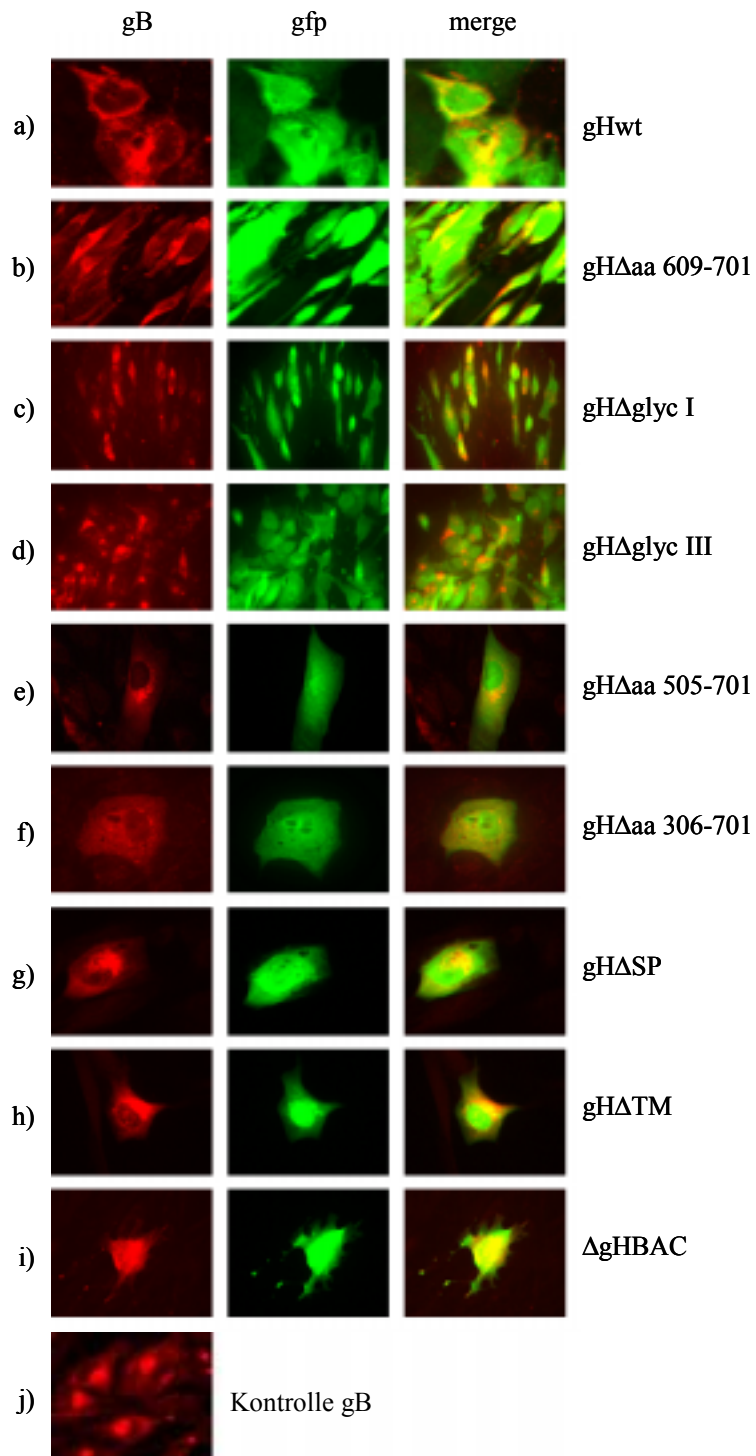


Abbildung 25: Fluoreszenzimmunologischer Nachweis des HCMV- gB in kotransfizierten Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz.

Nach Kotransfektion des HCMV- BACΔgHgf mit den mutagenisierten gH- Expressionsplasmiden wurden die entstehenden grün fluoreszierenden Zellen bzw. Plaques in der indirekten Immunfluoreszenz auf gB hin untersucht (a- h). Als Kontrollen wurde eine nach solitärer Transfektion des HCMV- BACΔgHgf entstandene grün fluoreszierend Einzelzelle (i) sowie als Positivkontrolle mit HCMV infizierte Zellen (j) auf gB untersucht. Rechts die Bezeichnungen der verwendeten Konstrukte (mikroskopische Vergrößerung 200x bei Plaques, 400x bei Einzelzellen).

Bei jedem der untersuchten Ansätze konnte, wie Abbildung 25 zeigt, in allen Ansätzen eine korrekte Expression und Lokalisation des gB nachgewiesen werden.

7.5 Herstellung und Charakterisierung einer Revertante des HCMV-BAC Δ gHgf

7.5.1 Herstellung und Reinigung einer Revertante

Um zu bestätigen, dass der Replikationsdefekt des HCMV- BAC Δ gHgf Folge der funktionellen Deletion des gH- Gens war und andere essentielle Strukturen des Genoms nicht beeinträchtigt waren, wurde eine Revertante generiert.

Dazu wurde eine Kotransfektion des HCMV- BAC Δ gHgf mit dem Cosmid PCM 1075 (Abb. 27; nt 84864- 119080; Fleckenstein et al., 1982; Chee et al., 1990) durchgeführt (s. 6.2.8). 5-7 Tage nach Kotransfektion zeigten sich erste grün fluoreszierende Plaques, deren kontinuierliche Ausbreitung als Hinweis auf die Entstehung einer Revertante gewertet wurde (Abb. 26 a).

Um auch die Freisetzung infektiöser viraler Partikel aus den kotransfizierten Zellen zu überprüfen, wurde das Kulturmedium nach Ausbildung eines zytopathischen Effektes auf frische Fibroblasten übertragen. Abbildung 26 b und c zeigt, dass auch nach Übertrag über zwei Passagen jeweils sich ausbreitende Plaques entstanden. Daraus lässt sich schließen, dass bei diesem experimentellen Ansatz eine Revertante entstanden war und dass bei dem HCMV- BAC Δ gHgf alle außerhalb des vom pCM1075 abgedeckten Bereich liegenden essentiellen Gene nicht beeinträchtigt waren.

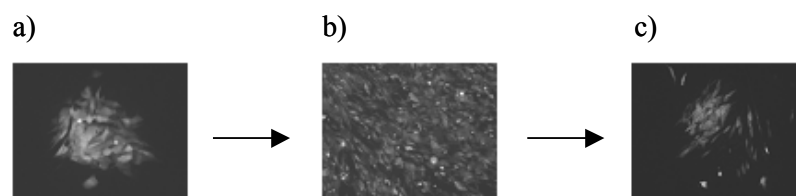


Abbildung 26: Untersuchung humaner Fibroblasten auf grün fluoreszierende Plaques.

a) nach Kotransfektion mit HCMV- BAC Δ gHgf und dem Cosmid 1075.

b) Plaques nach erstem Übertrag des Überstandes der Kotransfektion.

c) Plaques nach zweitem Übertrag des Überstandes der Kotransfektion.

(mikroskopische Vergrößerung 200x)

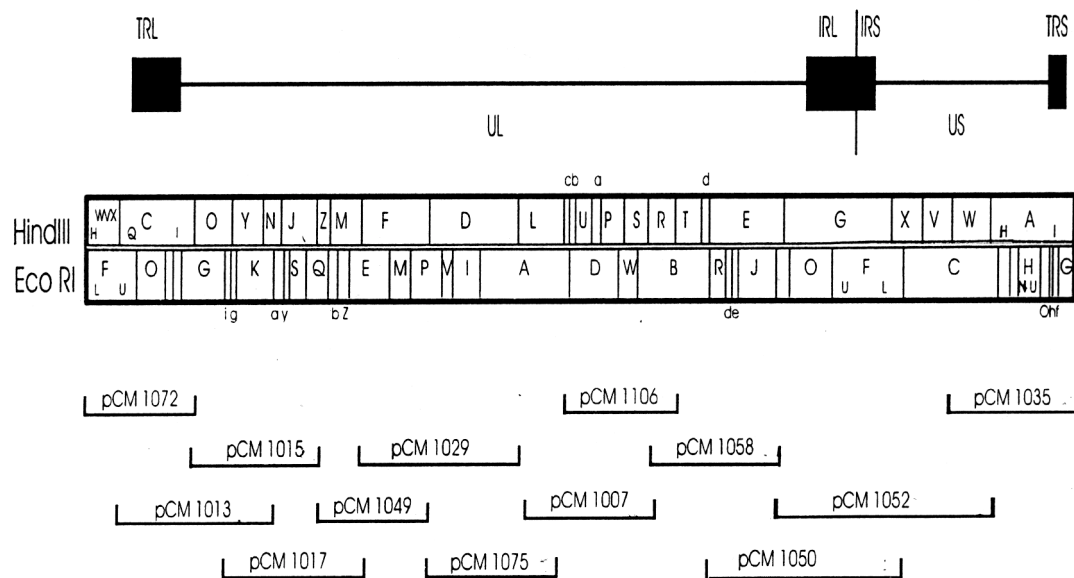


Abbildung 27: HCMV AD169- Fragmente nach HindIII- bzw. EcoRI- Verdau. Lage und Bezeichnung der 13 Cosmide.

7.5.2 Überprüfung der Revertante mittels „selektiver PCR“

Die Überprüfung auf Vorliegen der Revertante wurde mithilfe der PCR durchgeführt. Die hierfür verwendete DNA wurde im Falle der Kontrolle AD169 und der Revertante aus Zellüberständen gewonnen (s. 6.2.5), im Falle des HCMV-BAC Δ gHgfp mithilfe des „Nucleobond PC500 Kit“ der Firma Macherey/Nagel, Düren (s. 6.1.2). Es wurden drei Primerpaare (Abb. 28; Primer s. 5.16) gewählt. Die Primer USBhin (P4) und USBrück (P5) binden innerhalb der Region des US2- 11, die bei der Herstellung des HCMV- BACs deletiert wurde. Deshalb ergab sich das spezifische PCR- Fragment von 428 Basen Länge nur bei der Kontrolle AD169 (Abb. 29, Spur 1). Die Revertante sowie die zweite Kontrolle HCMV- BAC Δ gHgfp zeigten kein Fragment (Abb. 29, Spuren 4 und 7).

Ein Oligonukleotid des zweiten Primerpaares bindet innerhalb der im HCMV-BAC Δ gHgfp deletierten Region des gH (gHinnen3, P3), der andere innerhalb des noch vorhandenen Bereiches des gH- Gens (FlAre, P1). Daher zeigte sich das Produkt von 704 Basen Länge bei der Kontrolle AD169 und bei der Revertante

(Abb. 29, Spuren 2 und 8), nicht jedoch bei der Kontrolle, bei der das HCMV-BAC Δ gHgfp als Template eingesetzt wurde (Abb. 29, Spur 5).

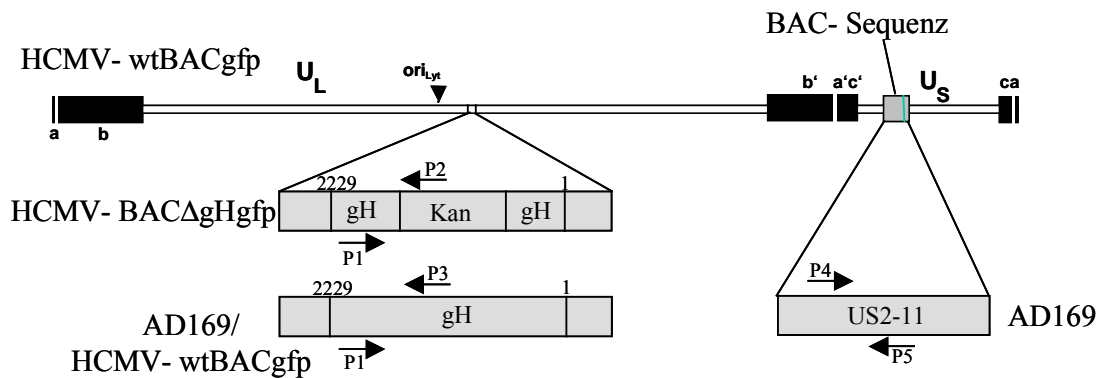
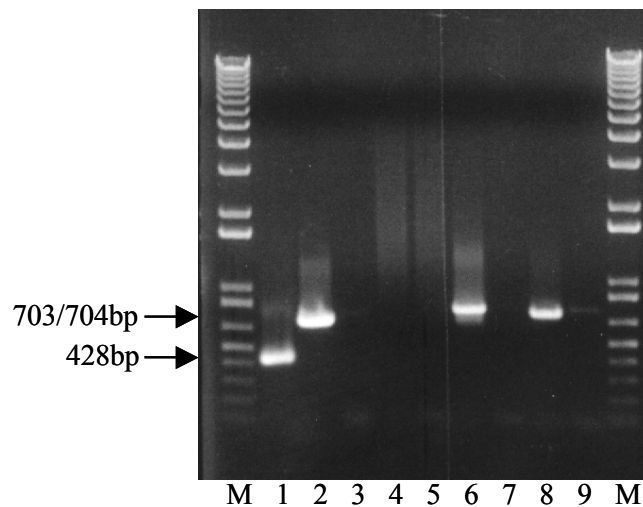


Abbildung 28: Strategie der selektiven PCR zum Nachweis der Revertante. Zur Bezeichnung der Primer P1- P5 siehe Text.

Ein Oligonukleotid (KanI, P2) des letzten Primerpaares bindet innerhalb des nur im HCMV- BAC Δ gHgfp vorhandenen Kanamycin- Resistenzgens, als zweites Oligonukleotid wurde wiederum der Primer FIAre (P1) eingesetzt. Bei der Kontrolle AD169 zeigte sich wie erwartet kein Produkt (Abb. 29, Spur 3); bei der Positivkontrolle HCMV- BAC Δ gHgfp zeigte sich das 703 Basen große spezifische Fragment (Abb. 29, Spur 6). Aus der Tatsache, dass auch bei der aus der Revertante isolierten DNA dieses Fragment schwach nachzuweisen war (Abb. 29, Spur 9), lässt sich schließen, dass die Revertante, die hier nach zweimaligem Passagieren eingesetzt wurde, noch nicht frei von HCMV- BAC Δ gHgfp- DNA war. Um die Revertante in reiner Form zu erhalten, wurden weitere Schritte der Aufreinigung (z. B. Plaquereinigung, weiteres Passagieren über mehrere Runden) angeschlossen, die jedoch noch nicht abgeschlossen sind.

a)



b)

Spur	Matrize	Primerkombination	Erwartetes Fragment
1	AD169	USBhin/USBrück	428 bp
2	AD169	FlAre/gHinnenIII	704 bp
3	AD169	FlAre/KanI	∅
4	HCMV- BACΔgHgfp	USBhin/USBrück	∅
5	HCMV- BACΔgHgfp	FlAre/gHinnenIII	∅
6	HCMV- BACΔgHgfp	FlAre/KanI	703 bp
7	Revertante	USBhin/USBrück	∅
8	Revertante	FlAre/gHinnenIII	704 bp
9	Revertante	FlAre/KanI	∅

Abbildung 29: Nachweis der Revertante mittels PCR.

a) Auftrennen der Produkte der selektiven PCR im 1 %igen Agarosegel. Zur Erklärung der Belegung der Spuren siehe Tabelle b).

b) Tabelle zur Übersicht der Spurenbelegung. In der ersten Spalte ist die Nummer der Spur aufgeführt, in der zweiten die verwendete Matrize, in der dritten die jeweils eingesetzte Primerkombination und in der vierten das zu erwartende Ergebnis (M = Marker).

7.5.3 Nachweis der Proteine gB, gH und IE in Plaques der Revertante

Auch in Plaques der Revertante sollte durch Immunfluoreszenzen die Expression der Proteine gB, gH und IE nachgewiesen werden.

Es zeigte sich, dass der Nachweis jedes dieser Proteine erwartungsgemäß in jeder Zelle eines Plaques möglich war (Abb. 30).

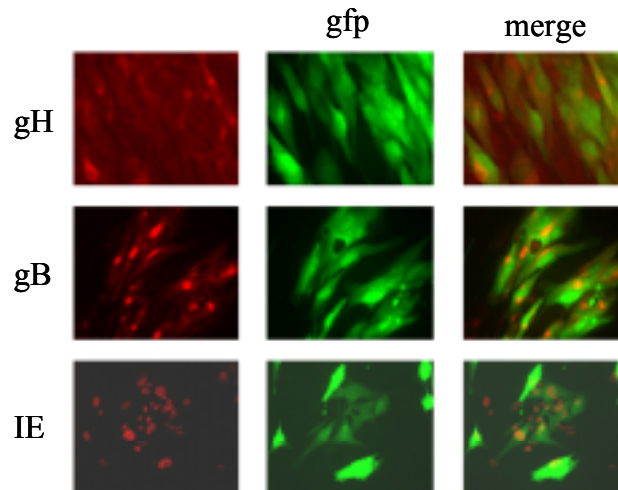


Abbildung 30: Fluoreszenzimmunologischer Nachweis der Proteine gB, gH und IE in Plaques. Die nach Kotransfektion des HCMV- BAC Δ Hgfp mit dem Cosmid 1075 entstandenen Plaques wurden in der Immunfluoreszenz auf die Expression der Proteine gH (pabgH), gB (mab58-15) und IE (Anti- HCMV- IE) untersucht. In der linken Bildreihe ist die gH, gB bzw. die IE- Fluoreszenz dargestellt, in der mittleren Bildreihe die jeweilige gfp- Fluoreszenz und rechts die jeweilige Überlagerung der beiden Fluoreszenzen (mikroskopische Vergrößerung 200x).

7.5.4 Wachstumskinetik der Revertante

Um die Replikationseffizienz und –geschwindigkeit der Revertante zu überprüfen, wurde die Wachstumskinetik mit der von aus HCMV- wtBACgfp entstandenen viralen Partikeln verglichen.

Dazu wurden MRC5 Zellen mit der Revertante bzw. mit HCMV- wtBACgfp- viralen Partikeln mit einer moi von 0,5 infiziert (s. 6.2.3) und das Kulturmedium einschließlich der infizierten Zellen nach 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 und 168 Stunden geerntet, die Zellen durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen, die Zelltrümmer abzentrifugiert und der Überstand titriert (s. 6.2.4). Es zeigte sich, dass die Titer für Revertante und HCMV- wtBACgfp- viralen Partikel nach zwei Replikationszyklen annähernd vergleichbar waren (Abb. 31). Die Kontamination der Revertante mit dem HCMV- BAC Δ Hgfp hatte offensichtlich keine Auswirkungen auf die Wachstumsgeschwindigkeit.

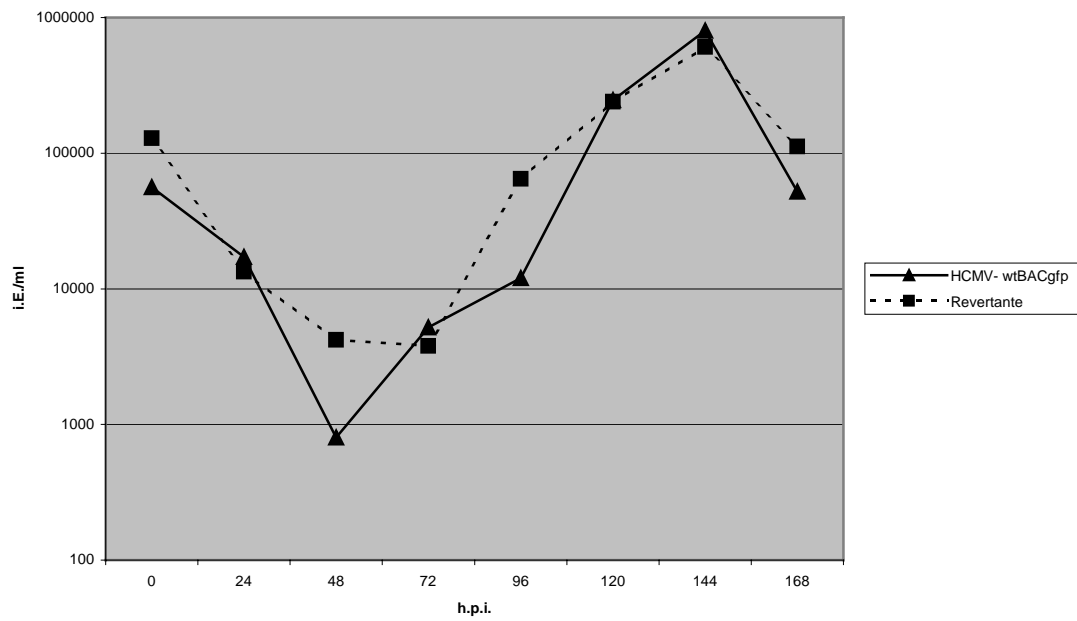


Abbildung 31: Vergleichende Wachstumskinetik der Revertante und des HCMV- wtBACgfp. Dargestellt ist die Anzahl infektiöser Einheiten (i.E.) der Revertante bzw. der HCMV- wtBACgfp-viralen Partikel in Abhängigkeit von der Zeit nach Infektion.

8. Diskussion

In dieser Arbeit sollte zunächst die grundsätzliche Bedeutung des Glykoproteins H für die HCMV- Vermehrung bestätigt werden. Da es sich bei gH um ein für die Virusvermehrung essentielles Protein handelt, bot sich für diese Untersuchungen die funktionelle Deletion des gH- Gens im BAC- System und die nachfolgende phänotypische Komplementation in trans durch authentisches gH als Methode der Wahl an. Im weiteren sollten funktionelle Domänen des gH durch Komplementation des HCMV- BAC Δ gHgfp mit Expressionsplasmiden durch gezielt mutagenisiertes gH identifiziert werden.

8.1 Bestätigung des Glykoproteins H als essentielles Produkt

Die Klonierung des HCMV- Genoms als *Bacterial Artificial Chromosome* (BAC; Borst et al., 1999) hat es erheblich vereinfacht, gezielt bestimmte Genprodukte hinsichtlich ihrer Funktion zu untersuchen, da es mittels dieses Systems möglich ist, gezielt Mutationen in das HCMV- Genom einzubringen. Dabei können die etablierten Methoden der Bakterienmutagenese genutzt werden. Es lassen sich so auch attenuierte Virusmutanten herstellen, die ohne Kontamination durch Wildtypvirus angereichert werden können. Die Einbringung von letalen Mutationen in das HCMV- Genom setzt allerdings die anschließende erfolgreiche phänotypische Komplementierung voraus, die wegen der spezifischen Eigenschaften des HCMV eine besondere experimentelle Herausforderung darstellt.

Um die essentielle Funktion des gH für die Vermehrung des HCMV zu bestätigen und im weiteren funktionelle Domänen des Proteins einzugrenzen, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Mutation zur funktionellen Deletion des gH- Gens eingeführt. Dazu wurden 282 AS im zentralen Bereich der gH- codierenden Sequenz deletiert und durch einen Selektionsmarker (Kanamycinresistenzgen) ersetzt. Das so hergestellte HCMV- BAC Δ gHgfp wurde in permissive humane Fibroblasten transfiziert. Es zeigte sich hierbei, dass im Gegensatz zu HCMV- wtBAC das HCMV- BAC Δ gHgfp nicht zur Entwicklung von grün fluoreszierenden Miniplaques

fürte. Weiterhin gelang die phänotypische Komplementation in trans durch authentisches gH, was außerdem zeigte, dass bei der Deletion des gH- Gens keine weiteren essentiellen Bereiche des viralen Genoms zerstört wurden.

8.2 Phänotypische Komplementation im HCMV- System

Für die phänotypische Komplementation des HCMV- BAC Δ gHgfp musste ein geeignetes System etabliert werden. Im Verlauf dieser Arbeit wurde eine Reihe experimenteller Ansätze überprüft.

Die homogene Expression eines Proteins in einem Zellsystem ist nicht gleichbedeutend mit der Eignung für die Komplementation einer letalen Virusmutante. Gerade im Fall der viralen Glykoproteine ist vermutlich die komplex regulierte Expression und Interaktion mit anderen viralen Komponenten entscheidend für den korrekten Transport und ihre Bioverfügbarkeit. So weist z.B. gB nach Expression in humanen Astrozytomzellen einen veränderten Glykosylierungsstatus auf (Reis et al., 1993) oder wird nach retroviraler Expression in Fibroblasten nicht gespalten (Strive et al., 2000). Diese Veränderungen deuten auf veränderte Transport- und Reifungsschritte hin (T. Strive, Doktorarbeit, 2001), die auch im Falle des gH die Bioverfügbarkeit verhindern könnten. Es ist anzunehmen, dass die Ursache für die erfolglosen Komplementationsversuche mit der permanenten Fibroblastenzelllinie sowie mit der stabil gH exprimierenden U373-Zelllinie auf dieser Ebene zu suchen ist.

Ein anderer Ansatz zur Herstellung komplementierender Zellen war die Verwendung rekombinanter Retro- Helferviren, die das gH- Gen tragen und ihre genetische Information nach Infektion in das Genom der Wirtszellen integrieren. Mittels solcher Helferviren konnten Fibroblasten in einer frühen Passage zur homogenen Expression des Glykoproteins B gebracht werden; die Komplementation eines entsprechenden HCMV- BACs mit einem Defekt im gB- Gen war jedoch auch in diesem System nicht erfolgreich (Strive *et al.*, 2000). Im Falle von gH scheiterten die hier durchgeführten Versuche bereits bei der Retrovirus- vermittelten gH- Expression.

Der Ansatz der Komplementation mittels adenoviraler Helferviren erwies sich als ungeeignet im Hinblick auf die Problemstellung, da aufgrund der Überinfektion mit HCMV die replikationsdefizienten Adenovirusvektoren offenbar durch frühe

Funktionen des HCMV komplementiert und dadurch hinsichtlich der Replikationskompetenz rekonstituiert wurden. Durch die schnelle adenovirale Vermehrung und die dadurch bedingte Zytotoxizität wäre die erfolgreiche phänotypische Komplementation des HCMV- BAC Δ gHgf verhindert worden.

Die phänotypische Komplementation des HCMV- BAC Δ gHgf gelang mithilfe transienter Expression des gH nach Kotransfektion eines gH- Expressionsplasmids und dem HCMV- BAC Δ gHgf. In diesem System war das rekombinante gH bioverfügbar, so dass eine Runde der Replikation des gH- defizienten BACs ermöglicht wurde. Für eine Anreicherung phänotypisch komplementierter Viren ist dieses System aufgrund der niedrigen Transfektionseffizienz allerdings nicht geeignet. Die wenigen freigesetzten Viren infizieren die umliegenden Zellen wieder abortiv und werden somit nicht weiter vermehrt. Es ließen sich lediglich wenige infektiöse Einheiten im Kulturüberstand durch Übertrag auf permissive Fibroblasten nachweisen.

8.3 Revertante des HCMV- BAC Δ gHgf

Für die Herstellung einer Revertante wurde eine Kotransfektion des HCMV- BAC Δ gHgf mit dem Cosmid 1075 (Fleckenstein et al., 1982) durchgeführt. Die Entstehung der Revertante als Ergebnis einer erfolgreichen homologen Rekombination war phänotypisch an der nach der Kotransfektion auftretenden Plaquebildung zu erkennen. Durch Übertrag der Überstände konnten infektiöse Partikel übertragen werden, die auf frischen Fibroblasten wiederum zur Plaquebildung führten.

Durch Kotransfektion des HCMV- BAC Δ gHgf mit den Expressionskonstrukten für authentisches gH wurde in keinem Fall die Entwicklung einer Revertante beobachtet. Dass dessen Erzeugung mithilfe des Cosmids einfach und reproduzierbar gelang, lässt sich nur bedingt über größere homologe Bereiche zwischen HCMV- BAC Δ gHgf und dem Cosmid 1075 erklären.

Der Nachweis, dass es sich um eine Revertante handelt, erfolgte über eine selektive PCR. Hierbei zeigte sich, dass der erhaltene Virusstock zwar die Revertante enthielt, jedoch noch nicht frei von HCMV- BAC Δ gHgf- Molekülen war. In Anwesenheit

der Revertante scheint die HCMV- BAC Δ gHgfp- DNA mitamplifiziert und mitverpackt zu werden. Der Versuch der Trennung der Revertante von den HCMV- BAC Δ gHgfp- Molekülen durch wiederholtes Passagieren über zwei Replikationsrunden war nicht erfolgreich. Grundsätzlich sollte die Reinigung der Revertante auf diesem Wege jedoch möglich sein.

Obwohl die Revertante noch nicht frei von kontaminierendem HCMV- BAC Δ gHgfp war, wurde die Wachstumskinetik mit der des HCMV- wtBACgfp verglichen. Es zeigten sich dabei keine Unterschiede. Dennoch sollten diese Versuche mit der aufgereinigten Revertante wiederholt werden.

8.4 Essentielle Domänen des gH

Zur Identifizierung essentieller Domänen des gH wurden Expressionskonstrukte hergestellt, in denen definierte Abschnitte des Moleküls gezielt mithilfe der Methode der *rekombinanten PCR* deletiert wurden. Durch die Deletion des Membranankers wurde eine lösliche Form des gH erhalten. gH liegt im gcIII- Komplex zusammen mit gL und gO vor und gL ist in transfizierten Zellen notwendig und ausreichend, damit der Transport des gH zur Cytoplasmamembran stattfinden kann (Kaye et al., 1992; Milne et al., 1998; Spaete et al., 1993). In infizierten Zellen ist hierfür vermutlich zusätzlich gO notwendig (Huber & Compton, 1999). Weder für gO noch gL ist ein Membrananker beschrieben, so dass anzunehmen ist, dass der gcIII nach Zerstörung des Membranankers des gH löslich wird und somit nicht mehr in die Virushülle integriert werden kann. In der Tat handelte es sich um eine für das Virus letale Mutation.

Als Negativkontrolle wurde das Signalpeptid deletiert, um die Translokation des gH ins Lumen des endoplasmatischen Retikulums zu unterbinden. Dieses Konstrukt war erwartungsgemäß nicht mehr in der Lage, eine Replikationsrunde zu komplementieren.

Kürzlich wurde für das Protein des US2 des HCMV, ein Typ I Membranprotein, beschrieben, dass dessen Signalpeptid nicht abgespalten wird (Gewurz et al., 2002). Die im gH vermutete entsprechende Spaltstelle wäre ebenfalls von Interesse, um festzustellen, welche Auswirkungen sich bei ihrer Zerstörung ergeben.

Da im zentralen Bereich des gH- Moleküls bislang noch keine definierten funktionellen Domänen bekannt sind, die sich für eine Überprüfung angeboten hätten, wurden hier größere Deletionen eingeführt, um essentielle Bereiche zu identifizieren. Diese Deletionen wurden mithilfe der *Exonuklease III* generiert. Die Größe der Deletion ist hier nur durch Steuerung der Reaktion über die Temperatur und die Zeit bis zu deren Abstoppen zu beeinflussen. So wurden drei unterschiedlich große Deletionen von 93, 197 und 396 AS hergestellt. Der Bereich von 93 AS vor dem Membrananker (AS 609-701) scheint keine essentielle Funktion zu besitzen, da sich nach Kotransfektion eines entsprechenden Konstruktes Miniplaques ausbildeten. Bei der Deletion von 197 (AS 505–701) bzw. 396 AS (AS 306–701) hingegen waren offenbar essentielle Bereiche betroffen, so dass die erfolgreiche phänotypische Komplementation des HCMV- BAC Δ gHgfp nicht mehr möglich war. Durch weitere Eingrenzung dieser deletierten Bereiche könnten die essentiellen Domänen genauer lokalisiert werden.

Weiterhin wurden bereits vorhandene gH- Konstrukte mit Mutationen der Glykosylierungsstellen verwendet. Bei der gH Δ glycI- Mutante des gH sind die drei N- terminal innerhalb der vom gH des Humanen Herpesvirus 6 abgeleiteten Interaktionsstelle mit gL (Anderson & Gompels, 1999) gelegenen Glykosylierungsstellen (AS 56-58, 63-65 und 68-71; s. Abb. 7.1.5), bei der gH Δ glycIII- Mutante nur die Glykosylierungsstellen an Aminosäureposition 56-58 und 68-71 mutiert, wodurch diese Glykosylierungsstellen funktionell deletiert sind. Beide Mutationen erwiesen sich als nicht letal. Deshalb ist zu vermuten, dass die Glykosylierung in diesem Bereich keine Voraussetzung z.B. für die Komplexierung mit gL bzw. gO ist.

Die für diese Untersuchungen durchgeführten Kotransfektionen führten reproduzierbar zu vergleichbaren qualitativen Ergebnissen. Die gleichzeitige Kotransfektion des pp71- Expressionsplasmides erhöhte die Transfektionseffizienz, was bereits für HCMV- DNA gezeigt wurde (Baldick et al., 1997). Dieser Effekt kommt wahrscheinlich durch die transaktivierenden Eigenschaften des pp71 auf den major IE- Promotor und andere virale Promotoren zustande (Baldick et al., 1997; Liu & Stinski, 1992). Dennoch war die Transfektionseffizienz sehr gering und veränderte sich zudem aufgrund der Eigenschaft der hier verwendeten primären humanen Fibroblasten, nach wiederholtem Passagieren eine geringere Transfektionseffizienz zu zeigen. So war die Anzahl der erhaltenen grün fluoreszierenden Einzelzellen bzw.

Miniplaques sehr unterschiedlich und es wurden, obwohl die Zellen lediglich von der 18 bis zur 26 Passage verwendet wurden, 2 bis 20 grün fluoreszierende Einzelzellen bzw. 1-5 Miniplaques pro μg BAC- DNA beobachtet. Außerdem war diese Anzahl offenbar auch von der Qualität der jeweiligen DNA- Präparation abhängig, die trotz standardisierter Bedingungen unterschiedlich zu sein schien. Auch eine längere Lagerung der BAC- DNA führte zu einer geringeren Transfektionseffizienz.

8.5 Weiterführende Untersuchungen

Ein interessanter Bereich des gH- Proteins, der in dem beschriebenen System untersucht werden könnte, ist die Interaktionsdomäne mit gL. Für HHV 6- gH wurde diese Domäne zur Interaktion mit HHV 6- gL auf die N- terminalen 230 AS eingegrenzt (Anderson et al., 1996). Für die Interaktion von HHV 6- gH mit HCMV- gL hingegen sind lediglich die N-terminalen 145 AS des HHV 6- gH notwendig. Diese Interaktion findet über Disulfidbrücken statt, so dass die Substitution der Cysteine des HCMV- gH in diesem Bereich weitere Erkenntnisse bringen könnte. So könnte festgestellt werden, ob eine Interaktion der beiden Moleküle für eine Vermehrung des Virus notwendig ist. HSV 1-gH interagiert mit HSV 1- gL hingegen nicht über Disulfidbrücken (Hutchinson et al., 1992), der genaue Mechanismus dieser Interaktion ist jedoch noch nicht bekannt. Offenbar erfolgt die Komplexierung der gH- Homologen bei den einzelnen Vertretern der Herpesviren durchaus unterschiedlich.

Hinsichtlich des ungewöhnlich kurzen cytoplasmatischen gH- Anteils wurde für HHV 6 eine direkte oder indirekte Funktion für die virusvermittelte Fusion postuliert (Anderson & Gompels, 1999). Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, den C- Terminus zu deletieren; diese Versuche blieben aufgrund experimenteller Schwierigkeiten jedoch ohne Erfolg.

Für weitere Untersuchungen bietet sich die N- terminale antigene Domäne an, die als Ziel neutralisierender Antikörper beschrieben wurde (Bogner et al., 1992; Urban et al., 1992). Dies könnte bedeuten, dass ihr eine Funktion vermutlich in der initialen Interaktion des HCMV mit der Wirtszelle zukommt.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen könnten bei allen gH- Mutationen weiteren Aufschluss über die funktionelle Bedeutung der gH- Domänen geben. Von

besonderem Interesse wären in diesem Zusammenhang die intrazellulären Knospungsprozesse, bei denen die Beteiligung des gcIII- Komplexes anzunehmen ist. Es könnte außerdem untersucht werden, ob die Entstehung gH- freier viraler Partikel stattfindet, die nicht infektiös sind, sich jedoch im Elektronenmikroskop nachweisen lassen. Für einen solchen experimentellen Ansatz wäre die Transfektion von semipermissiven U373- Zellen geeignet, die für Transfektionen besser geeignet sind als Fibroblasten und in denen die virale Morphogenese mit zwar verminderter, aber ausreichender Effizienz ablaufen kann (Kari & Gehrz, 1993).

9. Literaturverzeichnis

- Adler, H., Messerle, M., Wagner, M. & Koszinowski, U. H.** (2000). Cloning and mutagenesis of the murine gammaherpesvirus 68 genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *J Virol* **74**, 6964-74.
- Adler, S.** (1995). Immunoprophylaxis against cytomegalovirus disease. *Scand J Inf Dis* **99**, 105-9.
- Adlish, J. D., Lahijani, R. S. & St Jeor, S. C.** (1990). Identification of a putative cell receptor for human cytomegalovirus. *Virology* **176**, 337-45.
- Anderson, R.A & Gompels, U.A.** (1999). N- and C-terminal external domains of human herpesvirus-6 glycoprotein H affect a fusion-associated conformation mediated by glycoprotein L binding the N terminus. *J Gen Virol* **80**, 1485-94.
- Anderson R.A., Liu D.X., Gompels U.A.** (1996). Definition of a human herpesvirus-6 beta herpesvirus-specific domain in glycoprotein gH that governs interaction with glycoprotein gL: substitution of human cytomegalovirus glycoproteins permits group-specific complex formation. *Virology* **217(2)**, 517-26
- Andrassi, M.** (1996). Klonierung und Expression immundominanter Epitope von Strukturproteinen des Humanen Cytomegalievirus. Doktorarbeit am Fachbereich Humanmedizin Philipps- Universität Marburg.
- Baboonian, C., Blake, K., Booth, J.C. & Wiblin, C.N.** (1989). Complement independent neutralizing monoclonal antibody with differential reactivity for strains of human cytomegalovirus. *J Med Virol* **29**, 139-45.
- Baines, J.D. & Roizman, B.** (1991). The open reading frames UL3, UL4, UL10 and UL16 are dispensable for the replication of herpes simplex virus 1 in cell culture. *J Virol* **65**, 938-44.
- Baldick, C.J., Jr., Marchini, A., Patterson, C.E. & Shenk, T.** (1997). Human cytomegalovirus tegument protein pp71 (ppUL82) enhances the infectivity of viral DNA and accelerates the infectious cycle. *J Virol* **71**, 4400-8.
- Berkner, K. L. & Sharp, P. A.** (1983). Generation of adenovirus by transfection of plasmids. *Nucleic Acids Res* **11**, 6003-20.
- Bodnar, A. G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S. E., Chiu, C. P., Morin, G. B., Harley, C. B., Shay, J. W., Lichtsteiner, S. & Wright, W. E.** (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* **279**, 349-52.

- Bogner, E., Radsak, K., & Stinski, M.F.** (1998). The gene product of human cytomegalovirus open reading frame UL56 binds the pac motif and has specific nuclease activity. *J Virol* **72**, 2259-64.
- Bogner, E., Reschke, M., Reis, B., Reis, E., Britt, W. & Radsak, K.** (1992). Recognition of compartmentalized intracellular analogs of glycoprotein H of human cytomegalovirus. *Arch Virol* **126**, 67-80.
- Borst, E.M., Hahn, G., Koszinowski, U.H. & Messerle, M.** (1999). Cloning of the human cytomegalovirus (HCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*: a new approach for construction of HCMV mutants. *J Virol* **73**, 8320-9.
- Borst, E.M., Mathys, S., Wagner, M., Muranyi, W. & Messerle, M.** (2001). Genetic evidence of an essential role for cytomegalovirus small capsid protein in viral growth. *J Virol* **75**, 1450-8.
- Bresnahan, W.A., Hultman, G.E. & Shenk, T.** (2000). Replication of wild-type and mutant human cytomegalovirus in life- extended human diploid fibroblasts. *J Virol* **74**, 10816-8.
- Britt, W.J., Vugler, L., Butfiloski, E.J. & Stephens, E.B.** (1990). Cell surface expression of human cytomegalovirus (HCMV) gp55-116 (gB): use of the HCMV-recombinant vaccinia virus-infected cells in analysis of the human neutralizing antibody response. *J Virol* **64**, 1079-85.
- Britt, W.J. & Vugler, L.G.** (1992). Oligomerization of the human cytomegalovirus major envelope glycoprotein complex B (gp55-116). *J Virol* **66**, 6747-54.
- Britt, W.J. & Alford, C.A.** (1996). Cytomegalovirus. In *Fields Virology*, 3rd Ed.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.-M. & Short, J.M.** (1987). XL1-blue: A high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* **5**, 376-78.
- Chang, Y., Cesarman, E., Pessin, M.S., Lee, F., Culpepper, J., Knowles, D.M. & Moore, P. S.** (1994). Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* **266**, 1865-69.
- 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., Preddie, E., Satchwell, S.C., Tomlinson, P., Westom, K.M. & Barrell, B.G.** (1990). Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol* **154**, 125-69.
- Chen, C. & Okayama, H.** (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* **7**, 2745-52.

- Cherepanov, P. P. & Wackernagel, W.** (1995). Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* **158**, 9-14.
- Compton, T., Nepumoceno, R.R. & Nowlin, D.M.** (1992). Human cytomegalovirus penetrates host cells by pH-independent fusion at the cell surface. *Virology* **191**, 387-95.
- Compton, T., Nowlin, D. M. & Cooper, N. R.** (1993). Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology* **193**, 834-41.
- Cox, M. M.** (1983). The FLP protein of the yeast 2-microns plasmid: expression of a eukaryotic genetic recombination system in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 4223-7.
- Cranage, M.P., Smith, G.L., Bell, S.E., Hart, H., Brown, C., Bankier, A.T., Tomlinson, P., Barell, B.G. & Minson, T.C.** (1988). Identification and expression of a human cytomegalovirus glycoprotein with homology to the Epstein-Barr virus BXLF2 product, varicella-zoster virus gpIII, and herpes simplex virus type 1 glycoprotein H. *J Virol* **62**, 1416-22.
- Delecluse, H. J., Hilsendegen, T., Pich, D., Zeidler, R. & Hammerschmidt, W.** (1998). Propagation and recovery of intact, infectious Epstein-Barr virus from prokaryotic to human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8245-50.
- Dijkstra, J.M., Visser, N., Mettenleiter, T.C. & Klupp, B.G.** (1996). Identification and characterization of pseudorabies virus glycoprotein gM as a nonessential virion component. *J Virol* **70**, 5684-8.
- Dumas, A. M., Geelen, J. L., Weststrate, M. W., Wertheim, P. & van der Noordaa, J.** (1981). XbaI, PstI, and BglII restriction enzyme maps of the two orientations of the varicella-zoster virus genome. *J Virol* **39**, 390-400.
- Eggers M., Radsak K., Enders G., Reschke M.** (2001). Use of recombinant glycoprotein antigens gB and gH for diagnosis of primary human cytomegalovirus infection during pregnancy. *J Med Virol* **63(2)**, 135-42.
- Eickmann M., Lange R., Ohlin M., Reschke M. & Radsak K.** (1998). Effect of cysteine substitutions on dimerization and interfragment linkage of human cytomegalovirus glycoprotein B (gp UL55). *Arch Virol* **143(10)**, 1865-80.
- Epstein, M., Henle, W., Achoing, B. & Barr, Y.** (1965). Morphological and biological studies on a virus in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *J Exp Med* **121**, 761-70.

- Falk C.S., Mach M., Schendel D.J., Weiss E.H., Hilgert I. & Hahn G.** (2002). NK Cell Activity During Human Cytomegalovirus Infection Is Dominated by US2-11-Mediated HLA Class I Down-Regulation. *J Immunol* **169**(6), 2002 (im Druck).
- Farrar, G.H. & Greenaway, P.J.** (1986). Characterization of glycoprotein complexes present in human cytomegalovirus envelopes. *J Gen Virol* **67**, 1469-73.
- Fleckenstein, B., Muller, I. & Collins, J.** (1982). Cloning of the complete human cytomegalovirus genome in cosmids. *Gene* **18**, 39-46.
- Forrester, A., Farrell, G., Kaye, J., Davis-Poynter, N. & Minson, T.** (1992). Construction and properties of a mutant of herpes simplex virus type 1 with glycoprotein H coding sequence deleted. *J Virol* **66**, 341-8.
- Frenkel, N., Schirmer, E.C., Wyatt, L.S., Katsafanas, G., Roffmann, E., Danovich, R.M. & June, C. H.** (1990). Isolation of a new herpesvirus from human CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 748-52.
- Fuller, A.O., Santos, R.E. & Spear, P.G.** (1992). Herpes simplex virus type 1 entry through a cascade of virus-cell interactions requires different roles of gD and gH in penetration. *J Virol* **63**, 3435-43.
- Gewurz BE, Ploegh HL, Tortorella D.** (2002). US2, a human cytomegalovirus-encoded type I membrane protein, contains a non-cleavable amino-terminal signal peptide. *J Biol Chem* **277**(13), 11306-13.
- Gibson, W. & Irmiere, A.** (1984). Selection of particles and proteins for use as human cytomegalovirus subunit vaccines. *Birth Defects Orig Artic Ser* **20**, 305-24.
- Gillen, J. R., Willis, D. K. & Clark, A. J.** (1981). Genetic analysis of the RecE pathway of genetic recombination in Escherichia coli K-12. *J Bacteriol* **145**, 521-32.
- Gompels, U.A., Craxton, M.A. & Honess, R.W.** (1988). Conservation of Glycoprotein H (gH) in Herpesviruses: Nucleotide Sequence of the gH Gene from Herpesvirus Saimiri. *J Gen Virol* **69**, 2819-29.
- Ghosh-Choudhury, G., Haj-Ahmad, Y., Brinkley, P., Rudy, J. & Graham, F. L.** (1986). Human adenovirus cloning vectors based on infectious bacterial plasmids. *Gene* **50**, 161-71.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russel, W.C. & Nairn, R.** (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**, 59-72
- Gruter, W.** (1924). Das Herpesvirus, seine aetiologische und klinische Bedeutung. *Muench. Med. Wochenschr.* **71**, 1058-60.
- Gupta, P., St Jeor, S. & Rapp, F.** (1977). Comparison of the polypeptides of several strains of human cytomegalovirus. *J Gen Virol* **34**, 447-54.
- Halbert, D.N., Cutt, J.R. & Shenk, T.** (1985). Adenovirus early region 4 encodes functions required for efficient DNA replication, late gene expression and host cell shutoff.

- J Virol* **56**, 250-7.
- He, T.C., Zhiu, S., da Costa, L.T., Yu, J., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B.** (1998). A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci* **95**, 2509-14.
- Hirt, B.** (1967). Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J Mol Biol* **26**, 365-9.
- Hobom, U., Brune, W., Messerle, M., Hahn, G. & Koszinowski, U. H.** (2000). Fast screening procedures for random transposon libraries of cloned herpesvirus genomes: mutational analysis of human cytomegalovirus envelope glycoprotein genes. *J Virol* **74**, 7720-9.
- Huber, M.T. & Compton, T.** (1997). Characterization of a novel third member of the human cytomegalovirus glycoprotein H-glycoprotein L complex. *J Virol* **71**, 5391-8.
- Huber, M.T. & Compton, T.** (1998). The human cytomegalovirus UL74 gene encodes the third component of the glycoprotein H-glycoprotein L-containing envelope complex. *J Virol* **72**, 8191-7.
- Huber, M.T. & Compton, T.** (1999). Intracellular formation and processing of the heterotrimeric gH-gL-gO (gCIII) glycoprotein envelope complex of human cytomegalovirus. *J Virol* **73**, 3886-92.
- Hutchinson L., Browne H., Wargent V., Davis-Poynter N., Primorac S., Goldsmith K., Minson A.C., Johnson D.C.** (1992). A novel herpes simplex virus glycoprotein, gL, forms a complex with glycoprotein H (gH) and affects normal folding and surface expression of gH. *J Virol* **66(4)**, 2240-50.
- Jahn, G., Scholl, B.C., Traupe, B. & Fleckenstein, B.** (1987). The two major structural phosphoproteins (pp65 and pp150) of human cytomegalovirus and their antigenic properties. *J Gen Virol* **68**, 1327-37.
- Jarvis, M.A., Fish, K.N., Soderberg-Naucler, C., Streblow, D.N., Meyers, H.L., Thomas, G. & Nelson J.A.** (2002). Retrieval of human cytomegalovirus glycoprotein B from cells is not required for virus envelopment in astrocytom cells. *J Virol* **76/10**, 5147-55.
- Jones, T. R. & Muzithras, V. P.** (1992). A cluster of dispensable genes within the human cytomegalovirus genome short component: IRS1, US1 through US5, and the US6 family. *J Virol* **66**, 2541-6.
- Jones, T. R., Muzithras, V. P. & Gluzman, Y.** (1991). Replacement mutagenesis of the human cytomegalovirus genome: US10 and US11 gene products are nonessential. *J Virol* **65**, 5860-72.
- Kari, B. & Gehrz, R.** (1992). A human cytomegalovirus glycoprotein complex

- designated gC-II is a major heparin-binding component of the envelope. *J Virol.* **66**, 1761-4.
- Kari, B. & Gehrz, R.** (1993). Structure, composition and heparin binding properties of a human glycoprotein complex designated gC-II. *J Gen Virol* **74**, 255-64.
- Kaye, J.F., Gompels, U.A. & Minson, A.C.** (1992). Glycoprotein H of human cytomegalovirus (HCMV) forms a stable complex with HCMV UL115 gene product. *J Gen Virol* **73**, 2693-8.
- Keay, S. & Baldwin, B.** (1995). Update on the 92.5 kDa putative HCMV fusion receptor. *Scand J Infect Dis Suppl*, **99**, 32-3.
- Kemble G., Duke G., Winter R., Spaete R.** (1996). Defined large-scale alterations of the human cytomegalovirus genome constructed by cotransfection of overlapping cosmids. *J Virol* **70(3)**, 2044-8.
- Klupp B.G. & Mettenleiter T.C.** (1991). Sequence and expression of the glycoprotein gH gene of pseudorabies virus. *Virology* **182(2)**, 732-41.
- Kniess, N., Mach, M., Fay, J. & Britt, W.J.** (1991). Distribution of linear antigenic sites on glycoprotein gp55 of human cytomegalovirus. *J. Virol.*, **65**, 138-46.
- Krech, U.** (1973). Complement-fixing antibodies against cytomegalovirus in different parts of the world. *Bull World Health Organ* **49**, 103-6.
- Kropff, B., Landini, M.P. & Mach, M.** (1993). An ELISA using recombinant proteins for the detection of neutralizing antibodies against human cytomegalovirus. *J Med Virol* **39**, 187-95.
- Kumar, M. L. & Nankervis, G. A.** (1979). Cytomegalovirus infections. *South Med J* **72**, 854-61.
- Kyhse-Anderson, J.** (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamid to nitrocellulose. *J Bio Biophys Meth* **10**, 203-9.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227(259)**, 680-5.
- Landini, M.P., Guan, M.X., Jahn, G., Lindemaier, W., Mach, M., Ripalti, A., Necker, A., Lazzarotto, T. & Plachter, B.** (1990). Large scale screening of human sera with cytomegalovirus antigens. *J Clin Microbiol* **28**, 1375-9.
- Landini, M.P. & La Placa, M.** (1991). Humoral immune response to human cytomegalovirus proteins: a brief review. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **14**, 97-105.
- Landini, M.P., Ripalti, A., Sra, K., & Pouletti, P.** (1991). Human cytomegalovirus structural proteins: immune reaction against pp150 synthetic peptides. *J Clin Microbiol* **29**, 1868-72.

- Li, L., Nelson, J.A. & Britt, W.J.** (1997). Glycoprotein H-related complexes of human cytomegalovirus: Identification of a third protein of the complex gcIII. *J Virol* **71**, 3090-97.
- Li, Q., Turk, S.M. & Hutt-Fletcher, L.M.** (1995). The Epstein-Barr virus (EBV) BZLF2 gene product associates with the gH and gL homologs of EBV and carries an epitope critical to infection of B cells but not of epithelial cells. *J Virol* **69**, 3987-94.
- Lindquister, G.J. & Pellett, P.E.** (1991). Properties of the human herpesvirus 6 strain Z29 genome: G+C content, length and the presence of variable-length directly repeated terminal sequence elements. *Virology* **182**, 102-10.
- Liu, B & Stinski, M.F.** (1992). Human cytomegalovirus contains a tegument protein that enhances transcription from promoters with upstream ATF and AP-1 cis acting elements. *J Virol* **66**, 4434-44.
- Lorow, D. & Jessee, J.** (1990). Max Efficiency DH10B: A Host for Cloning Methylated DNA. *Focus*, 19-20.
- Mach, M., Kropff, B., Dal Monte, P. & Britt, W.** (2000). Complex formation by human cytomegalovirus glycoproteins M (gpUL100) and N (gp UL73). *J Virol* **74**, 11881-92.
- Macher, A. M., Reichert, C. M., Straus, S. E., Longo, D. L., Parrillo, J., Lane, H. C., Fauci, A. S., Rook, A. H., Manischewitz, J. F. & Quinnan, G. V., Jr.** (1983). Death in the AIDS patient: role of cytomegalovirus. *N Engl J Med* **309**, 1454.
- Mascolini, M.** (1996). CMV resistance: "more complicated than we thought". *J Int Assoc Physicians AIDS Care* **2**, 37-9.
- Matthews, T. & Boehme, R.** (1988). Antiviral activity and mechanism of action of ganciclovir. *Rev. Infect. Dis.* **10**, Suppl 3, 490-4.
- McGeoch, D.J., Dolan, A. & Ralph, A.C.** (2000). Toward a comprehensive phylogeny for mammalian and avian herpesviruses. *J Virol* **74**, 10401-6.
- McVoy, M.A. & Adler, S.P.** (1994). Human cytomegalovirus DNA replicates after early circularization by concatemer formation, and inversion occurs within the concatemer. *J Virol* **68**, 1040-51.
- McVoy M.A., Nixon D.E., Adler S.P. & Mocarski E.S.** (1998). Sequences within the herpesvirus-conserved pac1 and pac2 motifs are required for cleavage and packaging of the murine cytomegalovirus genome. *J Virol* **72(1)**, 48-56
- Meyer H., Bankier A.T., Landini M.P., Brown C.M., Barrell B.G., Ruger B., Mach M.** (1988). Identification and procaryotic expression of the gene coding for the highly immunogenic 28-kilodalton structural phosphoprotein (pp28) of human cytomegalovirus. *J Virol* **62(7)**, 2243-50.
- Messerle, M., Crnkovic, I., Hammerschmidt, W., Ziegler, H. & Koszinowski, U. H.**

- (1997). Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 14759-63.
- Milne, R.S.B., Paterson, D.A. & Booth, J.C.** (1998). Human cytomegalovirus glycoprotein H/ glycoprotein L complex modulates fusion-from-without. *J Gen Virol* **79**, 855-65
- Mülhardt, C.** (2000). Der Experimentator: Molekularbiologie 2. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin. In *Molekularbiologie*, 2. Auflage edn: Spektrum.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H.** (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*; **51** Pt 1, 263-73.
- Muyrers, J. P., Zhang, Y., Testa, G. & Stewart, A. F.** (1999). Rapid modification of bacterial artificial chromosomes by ET- recombination. *Nucleic Acid Res* **27**, 1555-7.
- Novak, J., Sova, P., Krchnak, V., Hamiskova, E., Zavadova, H. & Roubal, J.** (1991). Mapping of serologically relevant regions of human cytomegalovirus phosphoprotein pp150 using synthetic peptides. *J Gen Virol* **72**, 1409-13.
- Ojala, P.M., Sodeik, B., Ebersold, M.W., Kutay, U. & Helenius, A.** (2000). Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro. *Mol Cell Biol* **20**, 4922-31.
- Oram, J. D., Downing, R. G., Akrigg, A., Dollery, A. A., Duggleby, C. J., Wilkinson, G. W. & Greenaway, P. J.** (1982). Use of recombinant plasmids to investigate the structure of the human cytomegalovirus genome. *J Gen Virol* **59**, 111-29.
- Oram, R.J. & Herold, B.C.** (1998). Antiviral agents for herpes virus. *Pediatr Infect Dis* **17**, 652-53.
- Osterrieder, N., Neubauer, A., Fakler, B., Brandmuller, C., Seyboldt, C., Kaaden, O.R. & Baines, J.D.** (1997). Synthesis and processing of the equine herpesvirus 1 glycoprotein M. *Virology* **232**, 230-39.
- Ottemyer, A.** (1996). Untersuchungen zur Regeneration des humanpathogenen Cytomegalievirus durch Transfektion überlappender Cosmide. Doktorarbeit am Fachbereich Humanmedizin, Philipps- Universität Marburg.
- Pachl, C., Probert, W.S., Hermsen, K.M., Masiarz, F., Rasmussen, L., Merigan, T.C. & Speate, R.R.,** (1989). The human cytomegalovirus strain Towne glycoprotein H gene encodes glycoprotein p86. *Virology* **169**, 418-26.
- Pande, N. T., Maidji, K., Bruno, W., Kurz, M., Kosziniwski, U. L. & Pereira, L.** (2000). Transcomplementation of human CMV gB- null mutant viruses: analysis of essential glycoprotein functions in the context of infected cells. In *25th International Herpesvirus Workshop*. Portland, Oregon.

- Patterson, C. E. & Shenk, T.** (1999). Human cytomegalovirus UL36 protein is dispensable for viral replication in cultured cells. *J Virol* **73**, 7126-31.
- Peeters, B., de Wind, N., Broer, R., Gielkens, A. & Moormann, R.** (1992). Glycoprotein H of pseudorabies virus is essential for entry and cell-to-cell spread of the virus. *J Virol* **66**, 3888-92.
- Pfuller, R. & Hammerschmidt, W.** (1996). Plasmid-like replicative intermediates of the Epstein-Barr virus lytic origin of DNA replication. *J Virol* **70**, 3423-31.
- Plotkin S.A.** (2001). Vaccination against cytomegalovirus. *Arch Virol Suppl* **17**, 121-34
- Plotkin S.A., Starr S.E., Friedman H.M., Gonczol E. & Brayman K.** (1990). Vaccines for the prevention of human cytomegalovirus infection. *Rev Infect Dis* 1990 Sep-Oct; 12 Suppl 7, 827-38.
- Radsak, K.D., Brücher, K.H. & Georgatos, S.D.** (1991). Focal nuclear envelope lesions and specific nuclear lamin A/C dephosphorylation during infection with human cytomegalovirus. *Eur J Cell Biol* **54**, 299-304.
- Radsak K., Schneider D., Jost E. & Brucher K.H.** (1989). Alteration of nuclear lamina protein in human fibroblasts infected with cytomegalovirus (HCMV). *Arch Virol* **105(1-2)**, 103-12.
- Reis, E.** (1991) Untersuchungen zur affinitätschromatographischen Reinigung eines Membranglykoproteins des humanen Cytomegalievirus. Diplomarbeit am *Fachbereich Biologie*. Philipps- Universität Marburg.
- Reis, B., Bogner, E., Reschke, M., Richter, A., Mockenhaupt, T. & Radsak, K.** (1993). Stable constitutive expression of glycoprotein B (gpUL55) of human cytomegalovirus in permissive astrocytoma cells. *J Gen Virol* **74**, 1371-9
- Reschke, M.** (1990). Prokaryotische und eukaryotische Expression eines viralen Glykoproteins. Diplomarbeit am Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg.
- Reschke, M.** (1995). Strukturelle und funktionelle Eigenschaften eines isolierten Glykoproteins des Humanen Cytomegalievirus. Doktorarbeit am Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg.
- Reschke, M., Revello, M.G., Percivalle, E., Radsak, K. & Landini, M.P.** (1999). Constitutive expression of human cytomegalovirus (HCMV) gpUL75 (gH) in astrocytoma cells: a study of the specific humoral immune response. *Viral Immunol* **12**, 249-62.
- Roizmann, B., Carmichael, L.E., Deinhardt, F., Dethe, G., Nahmias, A.J., Plowright, W., Rapp, F., Sheldrick, P., Takahashi, M. & Wolf, K.** (1981). Herpesviridae definition, provisional nomenclature and taxonomy. *Intervirology* **16**, 201-1.
- Roizman, B., Desroisiers, R., B., F., Lopez, C., Minson, A. & Studdert, M.** (1992).

- The family herpesviridae: an update. *Arch. Virol.* **123**, 425-449.
- Saeki, Y., Ichikawa, T., Saeki, A., Chiocca, E. A., Tobler, K., Ackermann, M., Breakefield, X. O. & Fraefel, C.** (1998). Herpes simplex virus type 1 DNA amplified as bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*: rescue of replication-competent virus progeny and packaging of amplicon vectors. *Hum Gene Ther* **9**, 2787-94.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T.** (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 5463-7.
- Schneeweis, K.E.** (1962). Serologische Untersuchungen zur Typendifferenzierung des Herpesvirus Hominis. *Z. Immunitätsforsch. Exp. Ther.* **124**, 24-48.
- Schoppel, K., Kropff, B., Schmidt, C., Vornhagen, R. & Mach, M.** (1997). The humoral immune response against human cytomegalovirus is characterized by a delayed synthesis of glycoprotein specific antibodies. *J Infect Dis* **175**, 533-44.
- Schumacher, D., Tischer, B. K., Fuchs, W. & Osterrieder, N.** (2000). Reconstitution of Marek's disease virus serotype 1 (MDV-1) from DNA cloned as a bacterial artificial chromosome and characterization of a glycoprotein B-negative MDV-1 mutant. *J Virol* **74**, 11088-98.
- Shenk, T.** (1996) in *Fields Virology*, eds. Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., Chanock, R.M., Melnik, J.L., Monath, T.P., Roizman, B., Straus, S.E. (Lippincott, Philadelphia), pp. 2149-71.
- Shizuya, H., Birren, B., Kim, U. J., Mancino, V., Slepak, T., Tachiiri, Y. & Simon, M.** (1992). Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 8794-7.
- Silvestri M., Sundquist, V.A., Ruden, U. & Wahren, B.** (1991). Characterisation of major antigenic region on gp55 of human cytomegalovirus. *J Gen Virol* **72**, 3017-23.
- Simpson, J. A, Chow, J. C., Baker, J., Avdalovic, N., Yuan, S., Au, D., Co, M.S., Vasquez, M, Britt, W.J. & Coelingh, K.L.** (1993). Neutralizing monoclonal antibodies that distinguish three antigenic sites on human cytomegalovirus glycoprotein H have conformationally distinct binding sites. *J Virol* **67**(1), 489-96.
- Smith, G. A. & Enquist, L. W.** (1999). Construction and transposon mutagenesis in *Escherichia coli* of a full-length infectious clone of pseudorabies virus, an alphaherpesvirus. *J Virol* **73**, 6405-14.

- Smith, M.G.** (1956). Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus disease. *Proc Soc Exp Biol Med* **92**, 224-30.
- Smuda C., Bogner E., Radsak K.** (1997). The human cytomegalovirus glycoprotein B gene (ORF UL55) is expressed early in the infectious cycle. *J Gen Virol* **78 (Pt 8)**, 1981-92.
- Sodeik, B., Doms, R. W., Ericsson, M., Hiller, G., Machamer, C. E., van 't Hof, W., van Meer, G., Moss, B. & Griffiths, G.** (1993). Assembly of vaccinia virus: role of the intermediate compartment between the endoplasmic reticulum and the Golgi stacks. *J Cell Biol* **121**, 521-41.
- Sodeik, B., Ebersold, M.W. & Helenius, A.** (1997). Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J. Cell. Biol.* **136**, 1007-2.
- Spaete, R.R., Gehrz, R.C. & Landini, M.P.,** (1994). Human cytomegalovirus structural proteins. *J Gen Virol* **75**, 3287-308.
- Spaete, R. R. & Mocarski, E. S.** (1987). Insertion and deletion mutagenesis of the human cytomegalovirus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 7213-7.
- Spaete, R.R., Perot, K., Scott, P.I., Nelson, J.A., Stinski, M.F. & Pachl, C.** (1993). Coexpression of truncated human cytomegalovirus gH with the UL115 gene product or the truncated human fibroblast growth factor receptor results in transport of gH to the cell surface. *Virology* **193**, 853-61.
- Spaete R.R., Thayer R.M., Probert W.S., Masiarz F.R., Chamberlain S.H., Rasmussen L., Merigan T.C. & Pachl C.** (1988). Human cytomegalovirus strain Towne glycoprotein B is processed by proteolytic cleavage. *Virology* **167(1)**, 207-25.
- Stagno, S.** (1986). Cytomegalovirus infection: a pediatrician's perspective. *Curr Probl Pediatr* **16**, 629-67.
- Strive, T.** (1997). Untersuchungen zur Herstellung einer viralen Deletionsmutante mittels gezielter Insertionsmutagenese. Diplomarbeit am *Fachbereich Biologie*. Philipps-Universität Marburg.
- Strive, T.** (2001). Charakterisierung funktioneller Domänen des Glykoproteins B des Humanen Cytomegalivirus. Doktorarbeit am *Fachbereich Biologie*, Philipps-Universität Marburg.
- Strive, T., Borst, E., Messerle, M. & Radsak, K.** (2000). Phänotypische Komplementation eines essentiellen Glykoproteins des humanen Cytomegalievirus (HCMV). Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Wien.
- Sullivan, V., Talaricio, C.,L., Stanat, S.C., Davis, M., Coen, D.M. & Biron, K.K.** (1992). A protein kinase homologue controls phosphorylation of ganciclovir in human cytomegalovirus-infected cells. *Nature* **359**, 85.
- Taylor, H.P. & Cooper, N.R.** (1990). The human cytomegalovirus receptor on fibroblasts

is a 30-kilodalton membrane protein. *J Virol* **64**, 2484-90.

- Tevethia M.J., Spector D.J., Leisure K.M., Stinski M.F.** (1987). Participation of two human cytomegalovirus immediate early gene regions in transcriptional activation of adenovirus promoters. *Virology* **161**(2), 276-85.
- Tooze, J., Hollinshead, M., Reis, B., Radsak, K. & Kern, H.** (1993). Progeny vaccinia and human cytomegalovirus particles utilize early endosomal cisternae for their envelopes. *Eur. J. Cell Biol.* **60**, 163-78.
- Urban, M., Britt, W.J. & Mach, M.** (1992). The dominant linear neutralizing antibody-binding site of glycoprotein gp86 of human cytomegalovirus is strain specific. *J Virol* **66**, 1303-11.
- Urban, M., Klein, M., Britt, W.J., Hassfurth, E. & Mach, M.** (1996). Glycoprotein H of human cytomegalovirus is a major antigen for the neutralizing humoral immune response. *J Gen Virol* **77**, 1537-4.
- Volchkov, V.E., Volchkova, V.A., Muhlberger, E., Kolesnikova, L.V., Weik, M., Dolnik, O. & Klenk, H.D.** (2001). Recovery of infectious Ebola virus from complementary DNA: RNA editing of the GP gene and viral cytotoxicity. *Science* **291**, 1965-9.
- Vornhagen, R., Plachter, B., Hinderer, W., The, T.H., Van Zanten, J., Matter, L., Schmidt, C.A., Sonneborn, H.H. & Jahn, G.** (1994). Early serodiagnosis of acute human cytomegalovirus infection by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant antigens. *J Clin Microbiol* **32**, 981-6.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J.** (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-19.

Meine akademischen Lehrer an der Philipps- Universität Marburg waren:

Herr Dr. Bremecker

Herr Professor Dilg

Frau Professor Feuser

Herr Dr. Gillmann

Herr Professor Haake

Herr Professor Hanefeld

Herr Professor Haneke

Herr Professor Hartke

Herr Dr. Häberlein

Herr Professor Hölzl

Herr Professor Imming

Herr Professor Kissel

Frau Professor Klumpp

Herr Professor Krieglstein

Herr Professor Kuschinsky

Herr Professor Matern

Herr Professor Matusch

Herr Professor Radsak

Herr Dr. Radziwill

Herr Professor Seitz

Frau Dr. Wichtl- Bleier

Danksagung

Herrn Prof. Dr. K. Radsak danke ich für die Überlassung des interessanten und vielseitigen Promotionsthemas, die außergewöhnliche fachliche und persönliche Betreuung und viele anregende Diskussionen.

Frau Dr. Gabriele Hahn vom Max von Pettenkofer- Institut in München danke ich für die Herstellung des HCMV- BAC Δ gHgfp.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Dobbstein danke ich für die Hilfe bei den Experimenten mit den adenoviralen Vektoren.

Allen ehemaligen und gegenwärtigen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe danke ich für eine tolle Arbeitsatmosphäre sowie ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Meiner Familie und Birgit danke ich für die Unterstützung während meiner gesamten Ausbildung.