

Aus dem Max von Pettenkofer – Institut
für Hygiene und medizinische Mikrobiologie
Lehrstuhl Virologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. U. H. Koszinowski

HERSTELLUNG VON INSERTIONS- UND
DELETIONSMUTANTEN DES MURINEN
ZYTOMEGALIEVIRUS UND DEREN UNTERSUCHUNG IN
VITRO UND IN VIVO

DISSERTATION
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

VORGELEGT VON
MATTHÄUS KRYCH
AUS POSEN

2005

Mit Genehmigung
der Medizinischen Fakultät
der Universität München

B E R I C H T E R S T A T T E R

Prof. Dr. med. U.H. Koszinowski

M I T B E R I C H T E R S T A T T E R

Priv. Doz. Dr. med. G. Längst

Prof. Dr. med. T. Löscher

D E K A N

Prof. Dr. med. D. Reinhardt

T A G D E R M Ü N D L I C H E N P R Ü F U N G

10. November 2005

MALE HABET MEDICUS, NEMO SI MALE HABUERIT

PUBLIUS SYRUS

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|------|--|----|
| 1. | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Die Familie der Herpesviridae..... | 1 |
| 1.2 | Die Struktur eines Herpesvirus | 1 |
| 1.3 | Genexpression beim Zytomegalievirus..... | 4 |
| 1.4 | Klinische Bedeutung des humanen Zytomegalievirus..... | 5 |
| 1.5 | Klinische Laboratoriumsdiagnostik einer HCMV Infektion..... | 7 |
| 1.6 | Primär- und Sekundärprophylaxe und Therapie der HCMV Erkrankungen..... | 7 |
| 1.7 | Assemblierung von Zytomegalievirus - Partikeln..... | 8 |
| 1.8 | Die Dissemination des Zytomegalievirus in vivo: Murines CMV als Modell | 9 |
| 1.9 | Mutagenese von murinen Zytomegalieviren..... | 10 |
| 1.10 | Rekombinante sezernierbare Markerproteine..... | 13 |
| 1.11 | Fragestellung und Zielsetzung..... | 14 |
| 2. | Materialien und Methoden..... | 16 |
| 2.1 | Materialien | 16 |
| 2.2 | Bakterielle Zellkultur..... | 22 |
| 2.3 | Molekularbiologie..... | 28 |
| 2.4 | Eukaryontische Zellkultur..... | 32 |
| 2.5 | Automatisierte Quantitative Nachweisverfahren: Quantifizierung von HBsAg und SEAP 37 | |
| 2.6 | Tierexperimentelle Verfahren..... | 38 |
| 3. | Ergebnisse | 40 |
| 3.1 | MCMV mit sezernierbaren Reporterproteinen..... | 40 |
| 3.2 | Charakterisierung der MCMV-Insertionsmutanten in vitro und in vivo | 44 |
| 3.3 | MCMV-Deletionsmutanten mit großen, mehrere Gene umspannenden Deletionen ... | 49 |

| | | |
|-----|---|----|
| 3.4 | MCMV- Deletionsmutanten mittels Transposonmutagenese sowie Herstellung von Revertanten dieser Deletionsmutanten..... | 55 |
| 4. | Diskussion | 70 |
| 4.1 | BAC Technologie: Insertionsmutanten und Deletionsmutanten. | 70 |
| 4.2 | Virämie und DNAämie sind kein direktes Abbild der in Organen stattfindenden CMV-Replikation. Marker Proteine erhöhen die Aussagekraft. | 74 |
| 4.3 | Transposons: klassische und reverse Genetik..... | 76 |
| 4.4 | Die Zerstörung des ORFs von M32, M34, M45, M47, M50, M76 und m165 führt zu einem attenuiertem Wachstum in Fibroblasten..... | 77 |
| 4.5 | Ausblick: Gene, die in vitro entbehrlich sind, spielen eine wesentliche Rolle bei der Virus- Wirt- Interaktion..... | 81 |
| 4.6 | ORF M76 und Exportdefizit von MCMV aus dem Nukleus..... | 82 |
| 4.7 | Ausblicke und Perspektiven..... | 83 |
| 5. | Zusammenfassung | 85 |
| 6. | Literaturverzeichnis..... | 86 |

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

| | |
|--|----|
| Abbildung 1. Elektronische Rekonstruktion von CMV..... | 2 |
| Abbildung 2. Schematische Darstellung Genomstruktur von humanem Zytomegalievirus HCMV. | 3 |
| Abbildung 3. Schematische Darstellung der Zusammensetzung einzelner Virusproteine zum Virion bei HCMV..... | 9 |
| Abbildung 4. Homologe Rekombination in E. coli | 27 |
| Abbildung 5. Insertion von Markergenen für HbsAg und SEAP ins MCMV Genom..... | 41 |
| Abbildung 6. A. Schematische Darstellung des klonierten Plasmides pSBC-SEAP..... | 42 |
| Abbildung 7. HindIII - Verdau der MCMV-BAC Mutanten im Vergleich zum MCMV-BAC Wildtyp..... | 43 |
| Abbildung 8. Sekretion von HBsAg bzw. SEAP in vitro..... | 44 |
| Abbildung 9. Sekretion von SEAP in NIH3T3 Fibroblasten..... | 44 |
| Abbildung 10. Detektion der Reporterproteine HBsAg und SEAP im Serum von B-Zell- defizienten BALB/c Mäusen..... | 45 |
| Abbildung 11. Detektion der Reporterproteine HBsAg und SEAP im Serum von γ -bestrahlten Mäusen..... | 47 |
| Abbildung 12. Infektionskinetik..... | 48 |
| Abbildung 13. Klonierstrategie für das Shuttleplasmids pST76L-rspL-LX..... | 51 |
| Abbildung 14. Kointegrat (links) und Deletionsmutante (rechts)..... | 52 |
| Abbildung 15. Klonierstrategie für das Shuttleplasmids pST76L-rspL-MM..... | 53 |
| Abbildung 16. Beispiele einer Festlegung Lokalisation der Transposon – Insertion mittels Restriktionsenzymverdau..... | 57 |
| Abbildung 17. Schematische Darstellung der Transposoninsertion in das MCMV Genom..... | 57 |
| Abbildung 18. Produktivität von infektiösem Virus in NIH 3T3 Fibroblasten | 62 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 19. Klonierstrategie für die Revertante zur Transposonmutante IVD9..... | 64 |
| Abbildung 20. Klonierstrategie für die Revertante zur Transposonmutante IIF4..... | 64 |
| Abbildung 21. EcoRI Verdau zur Überprüfung der Kointegration..... | 65 |
| Abbildung 22. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von NIH3T3 Fibroblasten, welche mit Wildtyp – MCMV und mit Transposon- Mutanten von M76 bzw. m165 infiziert worden sind. | 68 |

VERZEICHNIS DER TABELLEN

| | |
|--|----|
| Tabelle 1. Dargestellung der durch Sequenzierung identifizierten Insertionsstelle bei den langsam wachsenden MCMV- Transposonmutanten..... | 58 |
| Tabelle 2. Semiquantitative mikroskopische Analyse des Wachstumsverhaltens von MCMV- Transposonmutanten..... | 60 |
| Tabelle 3. Messung genomischer MCMV Äquivalente von MCMV – Wildtyp, MCMV-M32- Mutante und MCMV-M76 Mutanten 24h und 48 h p.i. im zytosolischen (C) bzw. im nukleärem (N) Kompartiment mit TaqMan™ PCR..... | 67 |

VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

| | |
|-----------|--|
| Ag | Antigen |
| Aq. dest. | Destilliertes Wasser (lat. Aqua destilata) |
| bp | Basenpaar |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| cAMP | Zyklisches Adenosinmonophosphat |
| CFU | Kolonieformierende Einheit (engl. colony forming unit) |
| CMV | Zytomegalievirus (engl. cytomegalovirus) |
| DMEM | Dulbeccos Modified Eagle Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (engl. desoxy ribonucleic acid) |
| dNTP | Desoxynucleosid-5'-triphosphat |
| E | Frühe Phase der Genexpression (engl. early) |
| E. coli | Escherichia coli |
| EBV | Ebstein-Barr Virus |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| ELISA | Enzymgebundener Immunoassay (engl. enzyme linked immuno sorbent assay) |
| EM | Elektronenmikroskop, Elektronenmikroskopie |
| FCS | Fetales Kälberserum (engl. fetal calf serum) |
| HBsAg | Oberflächenantigen des Hepatitis B Virus |
| HCMV | Humanes Zytomegalievirus |
| HHV | Humanes Herpesvirus |
| HSV | Herpes simplex Virus |
| IE | Sehr frühe Phase der Genexpression (engl. immediate early) |
| kbp | Kilobasenpaare (Basenpaare x1000) |

| | |
|------|--|
| L | Späte Phase der Genexpression (engl. late) |
| MCMV | Murines Zytomegalievirus (engl. murine cytomegalovirus) |
| MIEP | Majorer immediate early Promoter |
| MOI | Engl. multiplicity of infection |
| NCS | Serum des neugeborenen Kalbes (engl. newborn calf serum) |
| NIEP | Nichtinfektiöses umhülltes Partikel (engl. non-infectious enveloped particles) |
| OD | Optische Dichte |
| ORF | Offener Leserahmen (engl. open reading frame) |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. phosphate buffered saline) |
| PCR | Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction) |
| PFU | Engl. Plaque forming units |
| p.i. | Nach Infektion (lat. Post infectionem) |
| PLAP | Alkalische Phosphatase der Placenta |
| RNA | Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid) |
| Taq | Thermus aquaticus |
| Tris | Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| UV | Ultraviolett |
| VZV | Varizella Zoster Virus |
| WT | Wildtyp |

VERZEICHNIS DER VERWENDETEN METRISCHEN ANGABEN

| | |
|---------------|------------|
| d | Tag |
| h | Stunde |
| min | Minute |
| nm | Nanometer |
| μm | Mikrometer |
| mm | Millimeter |
| cm | Centimeter |
| pM | Picomolar |
| nM | Nanomolar |
| μM | Mikromolar |
| mM | Millimolar |
| M | Molar |
| μl | Mikroliter |
| ml | Milliliter |
| l | Liter |
| pg | Pikogramm |
| ng | Nanogramm |
| μg | Mikrogramm |
| mg | Milligramm |
| g | Gramm |
| Da | Dalton |
| kDa | Kilodalton |

| | |
|----|-------------------|
| mA | Milliampare |
| A | Ampare |
| V | Volt |
| °C | Grad nach Celsius |

1. EINLEITUNG

1.1 Die Familie der Herpesviridae

Die Familie der Herpesviridae umfasst gegenwärtig ca. 100 Viren, die bei zahlreichen Wirbeltieren vorkommen. Nur 8 Herpesviren sind bekannt, für die der Mensch der natürliche Wirt ist (96). Die humanen Herpesviren sind das Herpes Simplex Virus Typ 1 (HSV-1) und Typ 2 (HSV-2), das Varizella Zoster Virus (VZV), das Epstein-Barr-Virus (EBV), die humanen Herpesviren 6 und 7 (HHV 6, HHV 7), das Kaposi-Sarkom-assoziierte Virus oder humane Herpesvirus 8 (HHV 8), und das humane Zytomegalievirus (CMV). Die taxonomische Unterteilung in die drei Subgruppen, die Alpha-, Beta- und Gammaherpesvirinae, basiert vornehmlich auf dem biologischen Verhalten und der Struktur des Genoms. Alphaherpesvirinae (u.a. HSV-1, HSV-2 und VZV) haben eine kurze Replikationszeit als gemeinsames Charakteristikum; Betaherpesvirinae (u.a. CMV, HHV-6 und HHV-7) können sich nur langsam vermehren, und Gammaherpesvirinae sind typischerweise lymphotrop (u.a. EBV und HHV-8) (130). Diese biologische Einteilung entspricht nicht immer den genetischen Verwandtschaftsbeziehungen. Zum Beispiel sind HHV-6 und HHV-7 ebenso lymphotrop, werden jedoch aufgrund der engen genetischen Verwandtschaft zum CMV den Betaherpesvirinae zugeordnet (48). Unter allen Herpesviren zeigen Betaherpesvirinae die größte Speziespezifität (119).

1.2 Die Struktur eines Herpesvirus

Morphologische Struktur eines Herpesvirus. Herpesviruspartikel haben ein charakteristisches Aussehen: Sie bestehen aus einem ikosaederförmigen Kapsid von 100 nm Durchmesser (97), welches die doppelsträngige lineare DNA enthält und von einer amorphen, proteinhaltigen Matrix umgeben wird. Dieses sogenannte Tegument ist wiederum von einer Lipidmembran umgeben, auf der die oberflächlichen Glykoproteine zu finden sind. Kapsid, Tegument und

Lipidmembran ergeben zusammen das Virion. Reife Virionen haben eine Größe zwischen 150 und 200 nm. Sie enthalten etwa 30 Polypeptide mit einer Masse von 20 bis über 200 kDa.

Die dreidimensionale Struktur zeigt ein Kapsid, welches aus Triplexen, Pentons und Hexons zusammengesetzt ist und auf einer ikosaederförmigen Gitterstruktur beruht (32). Das Tegument besteht aus 960 filamentösen Untereinheiten, welche mit den Triplexen, Pentons und Hexons des Kapsids interagieren. Abbildung 1..

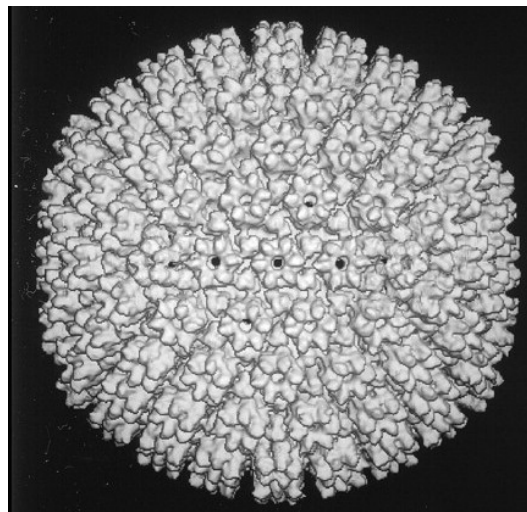


Abbildung 1. Elektronische Rekonstruktion von CMV.

Darstellung der elektronischen Rekonstruktion von Dichtewerten (Kryoelektronenmikroskopie) von nukleären B-Kapsiden von SCMV (Simian CMV) in einer 2,2 nm –Auflösung (äußere Oberfläche); Bild aus (149), Seite 2185, Fig. 3.

Genomische Struktur eines Herpesvirus. Herpesviridae sind DNS-Viren, deren doppelsträngige DNS nach Isolation aus dem Virion als lineares Molekül vorliegt, welches aus zwei kovalent gebundenen Segmenten besteht, der langen (L) und der kurzen (S) Region (131). L besteht aus einer nur einmal vorkommenden Sequenz (engl. unique sequence; abgekürzt U_L), welche von einem Paar repetitiver, invers orientierter Elemente (engl. terminal repeat; abgekürzt TR_L bzw. engl. internal repeat; abgekürzt IR_L) flankiert wird. In gleicher Weise besteht S aus den Bereichen IR_S , U_S und TR_S . Abbildung 2. Jeder Terminus besitzt eine Überhangsresidue mit einer

freien 3' Hydroxylgruppe. Die Residue spielt bei der Zirkularisation der DNA eine entscheidende Rolle (106). Diese Struktur, ursprünglich bei HSV-1 und EBV nachgewiesen, lässt sich auch für CMV nachweisen (160).

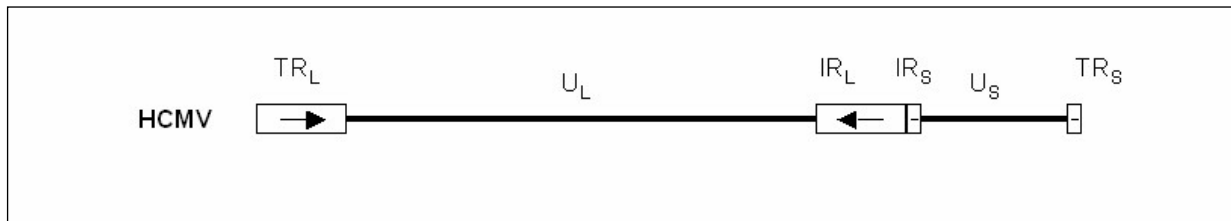


Abbildung 2. Schematische Darstellung Genomstruktur von humanem Zytomegalievirus HCMV. (nach McGeoch). Abkürzungen siehe Text.

Man bezeichnet die Genomstruktur des HCMV als Klasse E Genom. Es besteht aus zwei Komponenten U_L und U_S , die auch invertiert vorliegen können, so dass sich vier Sequenzisomere ergeben (104). Diese Inversionen werden durch die repetitiven Sequenzen vermittelt, welche sich an den Enden des Genoms und an den L-S-Verbindungsstellen befinden (77). Zytomegalieviren anderer Spezies inklusive Maus (MCMV) und Ratte (RCMV) haben weniger komplexe repetitive Sequenzen und zeigen keine genomischen Inversionen (Klasse A Genom) und somit nur ein genomisches Isomer.

Vollständige Sequenzen liegen für das HCMV Genom (31), das CMV von Ratte (151), das CMV von Rhesusaffe (RhCMV) (63), als auch das MCMV Genom (125) vor. Bei HCMV besteht das Genom aus 229.354 Basenpaaren (bp) mit einem vergleichsweise hohen G+C Gehalt von 56%. U_L ist 169.972 bp lang und U_S 35.418 bp. Das MCMV Genom ist 230.278 bp groß und hat einen G+C Gehalt von 58,7%. Man findet bei HCMV 208 theoretisch denkbare offene Leserahmen (ORF) und bei MCMV 170 ORFs, von denen 78 starke Homologie zu den HCMV ORFs zeigen. Der Konvention nach werden die zu HCMV Homologen MCMV ORFs mit einem groß geschriebenen „M“ gekennzeichnet (z.B. M32 von MCMV als Homolog zu UL32 von HCMV),

während die nicht homologen ORFs mit einem klein geschriebenen „m“ markiert werden (z.B. m165 von MCMV).

1.3 Genexpression beim Zytomegalievirus

Die drei Phasen der Genexpression. Nach Infektion werden die CMV Gene in drei unterscheidbaren Phasen exprimiert, die als sehr frühe (engl. immediate early, abgekürzt IE), frühe (engl. early, abgekürzt E) und späte Phase (engl. late, abgekürzt L) bezeichnet werden (95). Die Replikation verläuft langsam, so dass erst nach 48-72 h neu synthetisierte Virionen entdeckt werden können und das Umschalten von E nach L etwa 24-36 Stunden p.i. erfolgt (143). Die Expression der Gene während des Infektionszyklus ist komplex und vielfältig reguliert. Sicher ist, dass Expression von E- Phase- Genen abhängig ist von IE- Genprodukten, welche die E- Gen-Promotoren transaktivieren können (144). IE- Genprodukte zeigen sich 1h p.i., können durch zelluläre Faktoren wie zyklisches Adenosinmonophosphat in ihrer Expression stimuliert werden, und zeigen eine Autoregulation durch negative Feedback Inhibition, ähnlich wie man es auch von HSV-1 kennt (43). Die Produktion von IE- Genen ist obligat für die Transition in die E- bzw. L- Phase (51). E-Gene können im weiteren Verlauf der Expression herab reguliert werden oder aber auch in einer späten Phase des Infektionszyklus noch transkribiert werden.

Die immediate early Phase. Die erste Phase der Transkription (IE) beginnt gleich nach dem Eintritt des Virus in die Wirtszelle und ist unabhängig von viraler de novo Proteinsynthese. Daher findet die IE Transkription auch unter Anwesenheit von Proteinsyntheseinhibitoren wie Cycloheximid statt (146). Bei HCMV werden zwei genetische Elemente (IE-1 und IE-2) der IE Transkription von einem „major IE promoter“ (abgekürzt MIEP) kontrolliert und mindestens 3 IE RNAs transkribiert (99): IE-1 kodiert einen offenen Leserahmen für ein 72kDa Protein (IE72; ORF UL123). IE-2 Transkripte unterliegen mehreren Spleiß- Mechanismen, was zu einem 55 kDa Protein (IE55; ORF UL 122) und zu einem 86kDa Protein (IE86; ORF UL 122) führt (142).

Bei MCMV sind die ie-1 (m123) und ie-3 (m122) Produkte die Analoga zu HCMV IE-1 und IE-2. Zusätzlich wird ein drittes Genprodukt ie-2 über einen unabhängigen Promoter transkribiert, und zwar gegensinnig zu ie-1 und ie-3. ie-2 kodiert für ein gespleißtes 1,7 kb Transkript ohne bekannte Funktion und ohne Sequenzhomologie zu HCMV. Die Deletion von ie-2 bewirkt keine Änderung der Virusreplikation sowohl in vitro als auch in vivo (92).

Die early Phase. Die zweite Phase E folgt der IE Phase und ist abhängig von der Expression eines oder mehrerer IE Gene, die E Promotoren transaktivieren können. Insbesondere Genpromotoren für DNA Replikation werden aktiviert (139).

Die late Phase. Die späte Phase der Infektion wird vornehmlich von Gen- Transkripten dominiert, die in Strukturproteine (Tegument, Hülle) übersetzt werden (53). Der Nomenklatur entsprechend werden diese als L Gene bezeichnet.

1.4 Klinische Bedeutung des humanen Zytomegalievirus

Die Zytomegalie als morphologisches Phänomen ist seit annähernd 100 Jahren bekannt (129). Die Bedeutung von HCMV hat in den vergangenen 25 Jahren durch die Zunahme von transplantierten Patienten und die Ausbreitung der erworbenen Immunschwächeerkrankung AIDS dramatisch zugenommen. Solche Patienten zeigen eine Prädisposition für eine Neuinfektion mit CMV sowie gehäuft ein Auftreten einer Reaktivierung einer latenten Infektion, die zu einer schweren, lebensbedrohlichen Erkrankung werden kann. Die Primärinfektion mit HCMV kann vertikal und horizontal erfolgen. Die natürliche horizontale Transmission geschieht über engen Körperkontakt durch Körpersekrete, die vertikale Transmission kann konatal nach Infektion einer seronegativen Mutter und perinatal wenige Tage nach Niederkunft erfolgen (45).

Horizontale HCMV Infektion. Die horizontale HCMV Infektion verläuft beim Immunkompetenten entweder asymptomatisch oder als mildes, der Mononukleose ähnliches Krankheitsbild mit Fieber und Hepatitis, wie es als sog. Posttransfusionssyndrom seit 1966 nach

Bluttransfusionen bekannt ist (4). Die Infektiosität einer Transfusion ist mit der Leukozytenfraktion der Blutspende assoziiert: CMV lässt sich in Granulozyten und Monozyten des Spenders nachweisen (157). 40-79 % der Blutspender aus Industrienationen sind seropositiv für HCMV, in Entwicklungsländern gar 81-100 % (124). Zur Prävention werden die Transfundate leukozytendepletiert (135). Beim Immunsupprimierten zeigen sich dagegen die typischen Krankheitsmanifestationen der Zytomegalie, wie sie von der WHO 1996 definiert worden sind (100): Pneumonie, Enteritis, Hepatitis, Retinitis, Enzephalitis, Polyradikulitis und Graft-versus-Host Erkrankung. Bei Transplantatempfängern ist HCMV die am häufigsten auftretende Virusinfektion, und fast alle seropositiven Empfänger reaktivieren HCMV post transplantationem; seronegative Empfänger haben eine 85,1%-ige Chance für eine manifeste Primärinfektion (121).

Bei sehr schlechtem Immunstatus im Rahmen der Immunschwächekrankheit AIDS (fortgeschrittenes Stadium mit < 50 CD4-Zellen) kann eine Reaktivierung der CMV-Infektion zu einer Retinitis führen. Die CMV-Retinitis war früher eine häufige AIDS-Erkrankung, an der bis zu 30 % der Patienten erblindeten; heute ist sie eher eine Ausnahme. Sie tritt vor allem bei unbehandelten Patienten auf, die nicht selten erst im Rahmen dieser Manifestation als HIV-infiziert diagnostiziert werden (73). Andere Manifestationen einer disseminierten CMV-Infektion bei AIDS Patienten sind seltener, können aber jedes Organ betreffen. Eine Hepatitis in Assoziation mit einer (u.U. hämorrhagischen) Pneumonie, eine ulzerösen Ösophagitis, eine Kolitis oder eine Enzephalitis sind am häufigsten beschrieben wurden.

Vertikale HCMV Infektion. Die vertikale HCMV Infektion ist mit 0,2 – 2% aller Lebendgeburten die häufigste pränatale Virusinfektion (123). Von diesen Kindern zeigen ca. 10% Manifestationen einer kongenitalen HCMV- Infektion: Ikterus, Hepatosplenomegalie, hämorrhagische Diathese, ZNS- Erkrankungen, zerebrale Kalkablagerungen, Pneumonie. Viel häufiger allerdings ist die perinatale HCMV- Infektion ca. 10 Tage post partem, die mit einer

Pneumonie, einer Hämorrhagie und einer Hepatitis der HCMV Erkrankung gleicht, die erwachsene AIDS-Patienten entwickeln (38).

1.5 Klinische Laboratoriumsdiagnostik einer HCMV Infektion

Die WHO Leitsymptome reichen für die Diagnose einer Zytomegalie nicht aus. Zur einwandfreien Verifizierung sind confirmierende Labormethoden notwendig. Mit dem Nachweis von virusspezifischen Antikörpern im Serum als einfachstes Verfahren können IgG, IgM und die insbesondere die bei AIDS Patienten diagnostisch wertvollen IgA Antikörper nachgewiesen werden (158). Der direkte Virusnachweis erfolgt an Zentrifugationskulturen von humanen Fibroblasten (133), heute vor allem aber immunzytologisch im Blutausschlag anhand des viralen Strukturantigens pp65 an Leukozyten (7). Ein weiteres sensitives Verfahren in der Früherkennung ist die Bestimmung der genomischen Äquivalente in Vollblut, Plasma oder Serum mittels quantitativer PCR Verfahren (115) (siehe auch Kapitel 4.2.2).

1.6 Primär- und Sekundärprophylaxe und Therapie der HCMV Erkrankungen

Bis heute steht noch keine geeignete HCMV-Vakzine zur Verfügung. Durch die Latenzbildung, die Reaktivierung und den chronischen Verlauf ist die Impfung mit attenuierten Stämmen problematisch (118). Es konnte aber gezeigt werden, dass Vakzine mit Oberflächenproteinen (z.B. pp65) virusstammspezifische neutralisierende Antikörper erzeugen (54).

Bei Hochrisikopatienten kann prophylaktisch Aciclovir (ACV) oder Ganciclovir (GCV) gegeben werden. Wegen der einfacheren Applizierbarkeit haben sich die oralen Formen Valaciclovir und Valganciclovir ebenfalls bewährt (93). Ein adoptiver Ansatz ist die Gabe von HCMV-spezifischen CD8+-Klonen bei Knochenmarkstransplantierten Patienten; alle auf diese Weise therapierten Patienten entwickelten weder eine HCMV-Virämie noch eine Zytomegalie (155).

Therapeutisch wirksam sind vor allem das Nukleosidanalogue GCV, das Pyrophosphatanalogue Foscarnet (PFA) und das Nukleotidanalogue Cidofovir (HPMPC oder CDF). GCV wird durch

UL97 (Phosphotransferase) zu GCV-5'-monophosphat aktiviert und verdrängt als solches Deoxyguanosintriphosphat von UL54 (DNA-Polymerase). Der Einbau von GCV-Triphosphat führt zum Kettenabbruch bei der viralen DNA- Synthese (152). PFA ist ein direkter Polymeraseinhibitor und muss nicht aktiviert werden (79). Auch CDF ist nach Phosphorylierung ein Deoxyguanosintriphosphat-Kompetitor an UL54 und führt zu DNA- Kettenabbrüchen (34).

1.7 Assemblierung von Zytomegalievirus - Partikeln

Durch die gesteuerte Kaskade der Genexpression wird sichergestellt, dass Strukturproteine zum Ende eines produktiven Infektionszyklus produziert werden. Proteine des Kapsids werden zum Zellkern transportiert, wo sie sich zu immer reiferen Kapsiden zusammenfügen, die als A, B oder C bezeichnet werden. Nur C Kapside enthalten DNA (85). Aus dem Nukleus ausgeschleuste C Kapside erhalten im trans-Golgi-Netzwerk eine Umhüllung mit viral kodierten Glykoproteinen und werden so ein reifes Virion (132). B Kapside können ebenso eine Hülle erhalten und werden dann als non-infectious enveloped particles, abgekürzt NIEP, bezeichnet (72). Alternativ kann sich auch nur das Matrixprotein mit dem Molekulargewicht von 65 kDa in größere sphärische Strukturen assoziieren und zu einem „dense body“ umhüllt werden. Abbildung 3. Es ist bisher unklar, in welchem Umfang NIEPs und dense bodies bei der Infektion eines Wirts freigesetzt werden. Sie sind jedoch nicht infektiös, weil sie keine DNA enthalten. Dense bodies wurden in Zellen, die mit murinem CMV infiziert worden sind, nicht beobachtet. Die Reifung dieses Virus ist statt dessen mit der Ausbildung von Multikapsid-Virionen assoziiert (159).

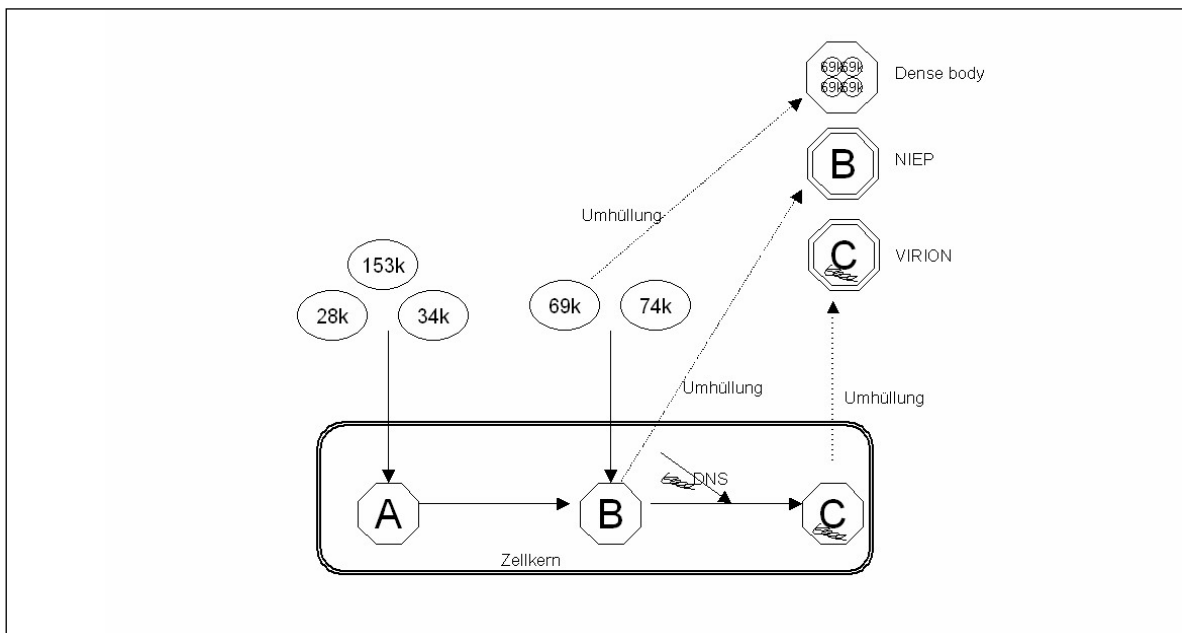


Abbildung 3. Schematische Darstellung der Zusammensetzung einzelner Virusproteine zum Virion bei HCMV
(mit Darstellung der Schritte, an welchen unreife Partikel umhüllt werden können)

1.8 Die Dissemination des Zytomegalievirus in vivo: Murines CMV als Modell

Die einzelnen Schritte der CMV Infektion in vivo sind bis heute noch nicht vollständig verstanden. Die Transmission benötigt engen Kontakt und erfolgt durch Körpersekrete, insbesondere durch Speichel (67). Die Übertragungsmechanismen sind unterschiedlich: bekannt ist eine intrauterine Übertragung mit der Folge einer kongenitalen Infektion, eine perinatale Übertragung durch infektiöses Scheidensekret im Geburtskanal, Muttermilch, infiziertes Blut, Blutprodukte und Knochenmark sowie eine Übertragung im Rahmen von sexuellen Kontakten. Die Prävalenz der Durchseuchung mit CMV wird je nach in Betracht gezogener Population sehr unterschiedlich mit 40-100% angegeben. In Deutschland liegt sie ungefähr bei 50%. Nach der Infektion verteilt sich CMV - am ehesten vermittelt durch phagozytierende Zellen - über die

Blutbahn in verschiedene Organe, wie Lunge, Leber, Milz, Speicheldrüsen und Gehirn (137). Über Monozyten / Makrophagen können Endothelzellen infiziert werden (154). Diese werden nach einer Infektion groß, lösen sich vom Gefäß ab und führen so zu einer weiteren Virusdissemination (57). Die strikte Speziespezifität erlaubt eine Infektion von Versuchstieren mit HCMV nicht. Daher verwendet man Zytomegalieviren von rodentiae (Maus, Ratte, Meerschwein) als ein Modellsystem für die HCMV Infektion. Insbesondere für die Beantwortung von Fragen, die nicht in einer klinischen Studie untersucht werden können, hat sich das MCMV Modellsystem als probates Werkzeug herausgestellt (24). Unter den CMVs von Tieren ist MCMV das am besten untersuchte Virus.

1.9 Mutagenese von murinen Zytomegalieviren

Ältere Verfahren der Mutagenese. Durch das Einbringen genetischer Alterationen in das untersuchte Genom und die Betrachtung des daraus resultierenden Phänotyps gewinnt man ein tiefes Verständnis über die Funktion einzelner Gene (23). Die Verwendung von Chemikalien als Mutagene zur Gewinnung von temperatursensitiven Virusmutanten ist ein seit 30 Jahren bekanntes, klassisch genetisches Verfahren (134). Die Interpretation der so gewonnenen Ergebnisse ist schwierig und mühsam. Zum einen muß die generierte Mutation erst gefunden werden, zum anderen müssen Zweitmutationen ausgeschlossen werden, um den kausalen Zusammenhang zwischen Einzelmutation und Phänotyp beweisen zu können. Durch Verwendung des wirtseigenen zellulären Rekombinations- und Reparaturapparates lassen sich Mutationen in eukaryontischen Zelllinien ortsspezifisch einführen (sog. Site-directed mutagenesis) (107), solange die Mutante angereichert und gereinigt werden kann. Dieses Verfahren kann misslingen, wenn die Mutante einen Selektionsnachteil, z.B. ein Wachstumsdefizit, aufzeigt. Mit Cosmiden können auch in Prokaryonten Mutationen generiert werden und nach Co-Transfektion in linearisierter Form wieder zu einem kompletten Virusgenom zusammengesetzt werden (166),(42).

Mutagenese mit homologer Rekombination in E.coli. Mit der Verwendung des gesamten viralen Genoms als BAC (bakterielles artifizielles Chromosom) macht man es der genetischen Technologie zugänglich, die für E. coli zur Verfügung steht. Das BAC Prinzip basiert auf dem F-Faktor von E. coli, dessen Replikation scharf kontrolliert wird (136). Das F-Plasmid liegt in binärer Kopie in der bakteriellen Zelle stabil vor und kann bis zu 600.000 bp DNA umfassen (98). Zur Herstellung eines MCMV-BAC wird die BAC Kasette mit viraler DNA in eukaryontischen Zellen co-transfiziert und mittels site directed mutagenesis in das virale Genom eingebaut. Nach Expansion der rekombinanten Viren kann die virale DNA geerntet und in E. coli transformiert werden, wo sie als BAC stabil erhalten wird (1),(19),(103). Restriktionsenzymprofile zeigen keine Deletionen oder Alterationen in klonierten viralen BAC-Plasmiden. BAC-DNA ist infektiös, so dass Zelllinien transfiziert werden können, und für weitere Replikation kompetentes Virus regeneriert werden kann. Die Kinetik der Replikation von aus BACs rekonstituiertem CMV ist nicht unterscheidbar von Wildtypvirus, solange die BAC-Kasette in einen nicht-essentiellen Bereich des Genoms inseriert wird (153). Der Austausch der Allele bei der weiteren Mutagenese kann wegen der Größe der BACs nicht durch Restriktionsenzymverdau und Ligation erfolgen, sondern erneut durch homologe Rekombination, die jedoch durch die Verwendung von Verfahren der bakteriellen Genetik einfacher und schneller durchführbar ist als in eukaryontischen Zellen (siehe auch Kapitel 2.2.5).

Mutagenese durch Insertion eines Transposon. Für die Analyse der Funktion einzelner Gene des CMV ist die Herstellung von Mutanten essentiell. Das schiere Größe des CMV Genoms und das langsame Wachstumsverhalten machen die Mutagenese mittels homologer Rekombination in Zellkultur zu einem mühsamen und zeitaufwändigen Prozess (105). Transposons sind mobile genetische Elemente, die sich selbst in das Genom integrieren können. Das Konzept für die Verwendung von Transposons zur Mutagenese von MCMV BAC basiert in wesentlichen auf zwei Punkten: zum einen haben manche Transposons keine Sequenzpräferenz bei der transpositionellen Insertion (69), zum anderen erzeugen sie meist nur eine einzelne singuläre

Insertion auf der Ziel DNA (84). Wenn das Transposon in einen offenen Leserahmen inseriert, kann das zu einer Trunkierung oder funktionellen Inaktivierung des Gens führen. Mit der Technik der direkten Transposon- Mutagenese eröffnet sich eine neue Methode zur raschen Identifikation von essentiellen und nicht-essentiellen Genen. Sehr gute Ergebnisse erzielt man durch Verwendung eines modifizierten, temperatursensitiven Tn1721 Transposons, welches mit hoher Präferenz in Plasmide transponiert (60). Ein Fusion mit pST76a, einem Plasmid mit einem temperatursensitiven Replikationsmechanismus bewirkt, dass die sog. pTsTM Plasmide nur bei Temperaturen von 30°C replikationsfähig sind (25). Bei 42°C sind nur solche pTsTM Plasmide replikationsfähig, die in ein BAC Plasmid transponiert sind, welches auch bei 42° replizieren kann. Mit der Wahl entsprechender Antibiotikaresistenzen ist es möglich, Bakterienkolonien zu selektieren, bei der solche Transpositionen stattgefunden haben (siehe auch Kapitel 2.2.6).

Mutagenese mittels ortsspezifischer Reinsertion (Site-directed mutagenesis). Anstatt ein Transposon zu verwenden, welches direkt in ein BAC Plasmid transponiert, ist es auch möglich, Transposons in ein Behelfsplasmid inserieren zu lassen, welches ein kloniertes (virales) Gen trägt, das analysiert werden soll. Geeignet für ein solches Verfahren ist Tn7, welches Insertionen von 15 bp im Behelfsplasmid hinterlässt (15). Damit lassen sich Bibliotheken von unterschiedlichen Mutanten eines einzelnen Gens herstellen. Zur Reinsertion des (mutierten) Behelfsplasmids in das virale Genom kann man sich der FLP Rekombinase bedienen, wenn zuvor entsprechende Erkennungsstellen (FRT-site) in das Behelfsplasmid bzw. das BAC kloniert worden sind. FLP Rekombinase vermittelt die ortsspezifische Rekombination zwischen den FRT Stellen und vereint so das BAC mit dem Behelfsplasmid (26). Dabei wird in aller Regel das mutierte Gen an ektopter Stelle reinsertiert. Reinsertiert man das mutierte Gen in eine Deletionsmutante, kann mit dieser Methode geprüft werden, ob und in wie weit die Wildtyp-Funktionalität wieder hergestellt werden kann. Weil unter Umständen 100 und mehr unterschiedliche Mutanten des Gens zur Verfügung stehen, kann zudem analysiert werden, welche Abschnitte des Gens für seine Funktion von besonderer Bedeutung sind.

1.10 Rekombinante sezernierbare Markerproteine

Für CMV gibt es kein nachweisbares Reporterprotein. Wie zuvor erörtert ist MCMV ein etabliertes System zur Untersuchung einer CMV Infektion *in vivo*. Um die Virusaktivität von infizierten Mäusen während der Primärinfektion, der Latenz und der Phasen der Reaktivierung zu bestimmen, müssen Tiere getötet und die Virustiter in verschiedenen Organen bestimmt werden (75). Es gibt kein Reporterprotein, welches von infizierten Zellen sezerniert wird und so die sequenzielle Überwachung der Virusproduktivität im selben Versuchstier ermöglicht.

HBsAg als Reporterprotein. Ein ideales Reporterprotein sollte sensitiv sein und leicht quantifizierbar. Dies trifft zum Beispiel für das Oberflächenantigen des Hepatitis B Virus (HBsAg) zu, welches vom S Gen dieses Virus kodiert wird. Durch die Insertion in *Vaccinia* konnte die Promotorregion der RNA Polymerase des Vacciniavirus charakterisiert werden, indem HBsAg im Überstand gemessen wurde (6). Durch Einbau in die E3 Region von Adenovirus Typ 5 konnte HBsAg sowohl *in vitro* als auch *in vivo* sezerniert werden und so ein neuartiges Hamstermodell zur Analyse der Immunogenität von Adenovirus etabliert werden (111). Der Einbau in Vacciniavirus bewirkt eine Immunogenität von HBsAg in Mäusen (81). Die Detektion von HBsAg mittels ELISA ist hochspezifisch.

SEAP als Reporterprotein. Die die Messung einer Enzymaktivität könnte sensitiver und quantifizierbarer sein als die Bestimmung eines Antigentiters. Die sezernierbare alkalische Phosphatase (SEAP) wird als ein hochsensitiver Reporter für Transfektionsexperimente in Zellkultur verwendet (36). SEAP ist ein Derivat der alkalischen Phosphatase der Plazenta (PLAP), welche an Position 489 trunkiert wurde und so effizienter sezerniert wird als PLAP (10). PLAP ist ein Protein, welches nur bei höheren Primaten und beim Menschen gefunden wird. Sie kann von ossären und intestinalen Formen der alkalischen Phosphatase unterschieden werden,

weil PLAP bei 65°C resistent gegenüber einer Inaktivierung ist, und zudem eine Resistenz gegen die inaktivierende Substanz L-Homoarginin aufweist (35). Ihre Detektion basiert auf einem Chemolumineszenzverfahren mit 1,2-Dioxethan, was eine etwa 1000-fach höhere Sensivität mit sich führt als fluorometrische Verfahren (16). SEAP ist sowohl als Reporter in vitro als auch als Reporter in vivo brauchbar einzusetzen (148). SEAP konnte nach direkter Injektion eines Expressionsvektors in den M. tibialis cranialis von C57B1/6 Mäusen noch 3-28 Tage p.i. nachgewiesen werden (11).

1.11 Fragestellung und Zielsetzung

Da die Speziesspezifität der Zytomegalieviren eine experimentelle Infektion von Versuchstieren mit HCMV ausschließt, wird seit geraumer Zeit MCMV als ein praktisches Modellsystem für die Analyse der CMV-Infektion in seinem Wirt verwendet. Nach Inokulation des Versuchstieres lässt sich der Verlauf der akuten MCMV-Infektion und der Reaktivierung durch die Bestimmung von Virustitern in verschiedenen Organen ermitteln. Dies erfordert zum einen den Einsatz einer großen Zahl von Versuchstieren, zum anderen besteht keine Möglichkeit einer intraindividuellen Betrachtung. In der vorliegenden Studie wird ein Gen für ein sezernierbares Markerprotein in das MCMV-Genom eingefügt. Mit Hilfe von Markern würde sich die Virusaktivität einfach und quantitativ in Serumproben infizierter Mäuse messen lassen. Mittels quantitativer PCR sollte die Anzahl zirkulierender MCMV Virionen im Blut erfassbar werden. Damit ließe sich der Verlauf der Infektion in ein- und demselben Tier auf einfache Weise beobachten und quantifizieren.

Nur wenige der offenen Leserahmen von CMV sind essentiell für eine Virusvermehrung in Zellkultur. Die Funktion der vielen entbehrlichen MCMV- Gene liegt wahrscheinlich in der Virus-Wirt-Interaktion. Für das Verständnis der CMV-Pathogenese ist daher die Identifizierung solcher entbehrlicher Gene entscheidend. Die weitere Analyse der Funktion eines einzelnen Gens ist leichter, wenn das Fehlen des Gens einen veränderten Phänotyp hervorruft. Die

Untersuchung von Mutantenbibliotheken verspricht dabei besondere Chancen für das Auffinden von Genen, welche messbar die Pathogenität beeinflussen. Für diesen Zweck könnten Bibliotheken von MCMV-Transposonmutanten effektiv eingesetzt werden. Nach dem Prinzip der klassischen Genetik ist kann dann vom Phänotyp auf den Genotyp geschlossen werden.

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 Materialien

Alle verwendeten Chemikalien stammten von den Firmen Sigma (Deisenhofen) und Merck KGaA (Darmstadt), soweit nicht anders angegeben. Petrischalen und Zellkulturplatten stammten von den Firmen Greiner (Frickhausen) oder Nunc (Wiesbaden).

2.1.1 Chemikalien und Lösungen

Agarose; Roth GmbH & Co., Karlsruhe

AmpliTaQ Gold DNA Polymerase; Applied biosystems, Foster City, CA, USA

Antibiotika Ampicillin, Chloramphenicol, Kanamycin, Strptomycin, Tetracyclin; Gibco Life Technologies GmbH, Eggenstein

Blood & Cell Culture DNA Mini Kit; QiaGen GmbH, Hilden

Cycloheximid (Actidion, beta -(3', 5' -Dimethyl -2' -oxocyclohexyl) -2 -hydroxyethylglutarimid),

Phosphonoacetat, Actinomycin D; Merck KGaA

DNA-Molekulargewichtsmarker VIII; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Eisessig; Merck KGaA

EDTA; Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz

Ethanol (absolut); Roth GmbH & Co., Karlsruhe

Ethidiumbromid; Roth GmbH & Co, Karlsruhe

Expand™ Hi Fidelity DNA Polymerase; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Fetales Kälberserum (FCS); Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

D-Glukose; Merck KGaA

Great EscAPe™ SEAP Chemoluminescence Assay; Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, CA, USA

dNTP-Mix 10 mM; Life Technologies, Karlsruhe

Glycerin 60%; Merck KGaA

Glutaraldehyd 25 %; Merck KGaA

Hefe Extrakt; Roth GmbH & Co., Karlsruhe,

Isopropanol; Roth GmbH & Co., Karlsruhe

Kaliumchlorid (KCl); Merck KgaA

Klenow-Enzyme und Klenow-Enzyme Puffer, sequencing grade; Roche Diagnostics GmbH,
Mannheim

LB broth [Sigma L3022]

Luria Broth (Miller) [SIGMA L3397]

Magnesiumchlorid (MgCl₂); Merck KGaA

Mercaptoethanol; Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz

Methanol p.a.; Merck KGaA

MF-Millipore Membranfilter 25 mm Durchmesser, 0,1 µm; Millipore GmbH, Schwalbach

Natriumchlorid (NaCl) reinst p.a.; Merck KGaA

Natriumkakodylat-3-hydrat (=Natriumcacodylat, Dimethylarsinsäure Na-Salz Trihydrat); Merck
KGaA

ORTHO® HBsAg System 2; Ortho-Clinical Diagnostics, Inc., Raritan, NJ, USA
US License 1236

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol; Sigma

Proteinase K; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

QIAGEN Plasmid Maxi Kit; QiaGen GmbH, Hilden

QIAprep Spin Miniprep Kit; QiaGen GmbH, Hilden

QIAquick Gel Extraction Kit; QiaGen GmbH, Hilden

Restriktionsenzyme und Puffer; New England Biolabs, Schwalbach, Deutschland

Restriktionsenzyme und Puffer; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

RNAse A aus Rinderpankreas; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Rinderserumalbumin (BSA); Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg

TaqMan Universal PCR Master Mix; Applied biosystems, Foster City, CA, USA

TRIS; Merck KGaA

Tryptone; Merck KGaA

Sachrose, Merck KGaA

SuperFect Transfection Reagent, 1,2 ml; QiaGen GmbH, Hilden

2.1.2 Medien und Puffer

CN-Puffer. Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, Igepal NP40 = CA630 1 %.

DMEM –Medium. (Dulbecco's Modified Eagle Medium), 500 ml; Fa. Gibco-Invitrogen

Einfriermedium. 70 ml RPMI –Medium (s.u.), 20 ml FCS, 10 ml DMSO

Kakodylatpuffer 0,1 M. 10,7 g Na-Kakodylat ad 500 ml aq. Dest., 0,1 M HCl ad pH7,2 –7,4

Ladepuffer für Agarosegele. 1 mM EDTA + 50% Glycerin + 0,25 % Orange G

LB-Medium für bakterielle Kulturen. 10 g Tryptone; 5 g Hefeextrakt (Yeast Extract); 8 g NaCl ad 1000 ml Aq. dest. Oder LB-broth [SIGMA L3022] 20 g ad 1000 ml Aq. dest. Die Lösung wird in 250 ml Duranglasflaschen aliquotiert und für 15 min. bei 121 °C autoklaviert.

PBS –Phosphate Buffered Saline, 500 ml, Fa. Gibco-Invitrogen

RPMI –Medium komplett mit L-Glutamin, 500 ml, Fa. Gibco-Invitrogen

S1-Lösung für DNA-Extraktion aus Bakterien. 50 mM Glukose; 25 mM TRIS; 20 mM EDTA; pH 8,0

S2-Lösung für DNA-Extraktion aus Bakterien. 0,25 mM NaOH; 1% SDS

S3-Lösung für DNA-Extraktion aus Bakterien. 3 M KOAc, pH 5,5

SOC-Medium für bakterielle Kulturen. Luria Broth (Miller) [SIGMA L3397] 1.55 g; 250 mM KCl 1 ml; 2 M MgCl₂ 0.5 ml; 1 M Glukose 2 ml ad 100 ml Aq. dest.. Die Lösung wird in 25 ml Duranglasflaschen aliquotiert und für 15 min. bei 121 °C autoklaviert

TAE-Puffer (Laufpuffer für kleine Agarosegele). 40 mM Tris-Acetat; 1 mM EDTA; pH 8,0

TBE-Puffer (Laufpuffer für große Agarosegele). 90mM Tris-Borat; 1 mM EDTA; pH8,0

TE-Puffer. 10 mM Tris; 0,1 mM EDTA, pH 8,0

TES-Puffer. 50 mM Tris, 20 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 8,0

2.1.3 Primer

| | |
|----------------|---|
| Hind E forward | 19-mer AAGGCCAACTCGTTAACCG |
| Hind E reverse | 19-mer TTGTTGCCTCGAAACATACG |
| M13 forward | 23-mer GCCGCTGTAAAACGACGGCCAGT |
| M13 reverse | 23-mer GGCCGCAGGAAACAGCTATGACC |
| Ie1/4fwd | 21-mer TGACCTAAACTCCCCAGGCAA |
| Ie1/4rev | 21-mer TAGGTGAGGCCATAGTGGCAG |
| Ie1/4p | [FAM]-TGCGGCACGCTCATCTAGTGCGT-[TAMRA]-p |
| Gla1fwd | 20-mer AGCGGTTTGCCTGTTCTTTG |
| Gla1rev | 21-mer CGAGTGAAGGGTAACGAGCAG |
| Gla1p | [VIC]- TGCTTACTGCACTCCCCGCAAATG-[TAMRA]-p |

2.1.4 Plasmide

| | |
|----------|--|
| pACYC177 | New England Biolabs, Schwalbach, Deutschland |
| pBK-CMV | Stratagene, La Jolla, CA, USA |
| pCOMX | M. Messerle, Medizinische Fakultät der Universität, Halle/Saale |
| pMBO96 | M. Messerle, Medizinische Fakultät der Universität, Halle/Saale |
| pSBC1 | H. Hauser, GBF-Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Braunschweig |
| pSBC2 | H. Hauser, GBF-Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Braunschweig |

| | |
|-------------|--|
| pSBC2-SEAP | H. Hauser, GBF-Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Braunschweig |
| pREP4 | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| pSL301 | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| pST76K_rpsL | M. Messerle, Medizinische Fakultät der Universität, Halle/Saale |
| pTsTM16 | Wolfram Brune, Würzburg |

2.1.5 Bakterienstämme und Zellen

Prokaryontische Zellen.

E.coli XL1-Blue, Fa. Stratagene, Heidelberg

E.coli DH5 α , eigener Bestand des Instituts

E.coli DH10B, eigener Bestand des Instituts

E.coli CBTS, eigener Bestand des Instituts

Eukaryontische Zellen.

NIH 3T3, murine Fibroblasten, American Type Culture Collection CRL1658

MEF, murine embryonale Fibroblasten von BALB/c Mäusen, eigener Bestand des Instituts

2.1.6 Geräte und Hilfsmittel

ABI 7700 Sequence Detector; Applied biosystems, Foster City, CA, USA

Agarosegel Elektrophorese Kammer „MIKRO“ von horizontal systems; LTF Labortechnik,
Wasserburg

Agarosegel Elektrophorese Kammer „MAXI II“ von horizontal systems; LTF Labortechnik,
Wasserburg

Begasungsbrutschrank Heraeus BB6060; Kendro Laboratory Products, Hanau

CCD Kamera Eagle Eye® II mit 100 V UV-Lichtquelle und Thermoprinter; Stratagene, La Jolla,
CA, USA

Cell Scraper®, Costar, Cambridge; Großbritannien

Cryotube®, USA Scientific Inc.; Ocala, FL, USA

Cytofluor II Fluorescence Multiwell Plate Reader; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

Elecsys® 1010 Elektrochemilumineszenzleser; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 ml, 0,7 ml); Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland

Falcon- Tubes; Becton Dickinson, San Jose, USA

Fuchs-Rosenthal-Zählkammer aus Glas

GeneAmp® 9700 PCR System; Applied biosystems, Foster City, CA, USA

Gene Pulser® I Elektroporationssystem für E. coli; Biorad Laboratories GmbH, München

Gene Pulser® II Elektroporationssystem für E. coli; Biorad Laboratories GmbH, München

Gewebekulturflaschen und –schalen; Greiner GmbH, Frickenhausen

Homogenisator nach Dounce (aus Glas)

Inkubatoren für Bakterien mit Schüttelfunktion; verschiedene Hersteller

Kühlzentrifuge Biofuge primo R; Heraeus Instruments, Gera

Küvette weit; Biorad Laboratories GmbH, München

Küvette (4,5 ml) schmal; Coulter-Immunotech-Diagnostics, Krefeld

Magnetrührer; MLW Rührgerätewerk Medingen, Sitz Freital

Lichtmikroskop Olympus CK 2; Olympus Europe Optical Co. GmbH, Hamburg

Lichtmikroskop Olympus CKX41; Olympus Europe Optical Co. GmbH, Hamburg

Lichtmikroskop Plympus BX50-51; Olympus Europe Optical Co. GmbH, Hamburg

96er und 24er Mikroliterplatten (MTP); Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen,

Mikrowelle Typ M 633; Samsung electronics GmbH, Steinbach

Pipetten Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH; Hamburg, Deutschland

Power Pack Basic Power Supply Stromquelle für Nukleinsäureelektrophoresen; BioRad Laboratories GmbH, München

Präzisionswaagen Typ 870-13; G. Kern & Sohn, Albstadt

Thermomixer® comfort; Eppendorf AG, Hamburg

Thermomixer® compact; Eppendorf AG, Hamburg

Transilluminator 2040EV; Stratagene, La Jolla, CA, USA

Zahnstocher aus Holz, sterilisiert

Zentrifuge gekühlt Centrifuge 5417 R; Eppendorf AG, Hamburg

Zentrifuge gekühlt Centifuge 5810 R; Eppendorf AG, Hamburg

2.2 Bakterielle Zellkultur

2.2.1 Kultur von E. coli

Für die Verwendung von Bakterien in später folgenden Experimenten (z.B. für Transformation) müssen aliquotierte Kulturen von kompetenten Bakterien bereitgestellt werden. 5 ml einer Übernachtskultur des entsprechenden Bakterienstammes wurden zu 40 ml LB-Medium gegeben. Die Lösung wurde bei 37°C in einem Bakterenschüttler inkubiert bis eine OD₆₀₀ von 0,2 erreicht wurde. Mit dieser Suspension wurden 500 ml frisches Medium angeimpft und unter wiederholten OD₆₀₀ Messungen weiter kultiviert. Sobald eine OD₆₀₀ von 0,6 erreicht worden war, wurde die Kultur 10 min auf Eis abgekühlt und dann 15 min bei 2700 x g und 4°C zentrifugiert. Die pelletierten Bakterien wurden in 500 ml eiskaltem Aq. dest. aufgenommen, wie oben abzentrifugiert, in 200 ml Aq. dest. resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 20 ml kaltem 10% Glycerin gelöst, erneut wie oben zentrifugiert und schließlich in 1,5 ml kaltem 10% Glycerin aufgenommen. Portionen von 40 µl wurden, nach kurzer Inkubation auf Eis, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu ihrer Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

Bakterienkulturen mit Plasmiden von Interesse, welche bei späteren Analysen wiederverwendet werden sollten, wurden unter Zugabe von Glycerin bei -80°C haltbar gelagert. Hierfür wurde ein Aliquot (1,25 ml) der bakteriellen Kultur mit 250 µl Glycerin 60% vermischt und in einem

Cryotube[®] gelagert. Eine Konzentration von 10% Glycerin sollte nicht unterschritten werden. Anschließend wurden die so haltbar gemachten Bakterienstämme bei -80° eingefroren.

2.2.2 Transformation von E. coli mittels Elektroporation

Für die Transformation von Plasmid- DNA wurden E. coli-Bakterien verwendet. Für Klonierungen wurden die Stämme XL1-blue, DH5 α oder DH10B verwendet. Dazu wurden 1 bis 50 ng der zu transformierenden DNA mit 40 μ l Lösung von kompetenten Bakterien gemischt und für 5-10 Minuten auf Eis gestellt, damit eine Anlagerung der DNA an die Bakterien erfolgen konnte. Anschließend wurde die Lösung in eine GenePulser[®] Küvette gebracht und nach erfolgtem Stromstoß (Standardeinstellung R=400 Ohm; U=2,5 Volt; C=25) sofort mit 1 ml 37°C warmen SOC – Medium aufgefüllt. Unter leichtem Schütteln wurden dann die Bakterien bei 37°C für 1 h bebrütet. Anschließend wurden 2 μ l bzw. 20 μ l bzw. 200 μ l der Bakterienkultur auf Agarplatten ausplattiert und über Nacht in einem Brutschrank bei 37°C bebrütet. Unter Berücksichtigung des entsprechenden Resistenzgens in einzelnen Plasmiden konnten durch Auswahl des richtigen Antibiotikums, mit dem die Agarplatte zuvor getränkt worden war, transformierte Bakterien, bei denen es zu einer Aufnahme des Plasmides durch Elektroporation gekommen war, selektioniert werden.

2.2.3 Präparation von Plasmiden aus Bakterien

Zur Verifizierung einer erfolgreichen Transformation wurden 7-14 bakterielle Kolonien von einer Agarplatte mit einem autoklavierten Zahnstocher gepickt, in je 5 ml LB-Medium unter Zugabe des entsprechenden Antibiotikums übergeführt und über Nacht bei 37°C bebrütet. 1,5 ml dieser Kultur wurden für 30 sec. bei 5000 g zentrifugiert und in 100 μ l S1-Lösung resuspendiert. Anschließend erfolgte die alkalische Lyse der Bakterien durch Hinzugabe von 200 μ l S2-Lösung, kurzes Mischen und Inkubation auf Eis für 5 Minuten. Es lässt sich ein Aufklaren der Suspension durch die erfolgte Lyse beobachten. Durch die Hinzugabe von 200 μ l S3-Lösung erfolgte die

Neutralisierung und die konsekutive Präzipitation von Zellproteinen und Zellschrott nach kurzem, kräftigen Schütteln. Nach 5 -minütiger Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen. Die darin enthaltenen Nukleinsäuren konnten durch Phenol:Chloroform Extraktion extrahiert werden, falls die Verwendung in weiteren Projekten beabsichtigt worden war (s.u.) oder durch einfaches Ausfällen mit Alkoholen, falls DNA nur für analytische Zwecke gewonnen werden sollte (s.u.).

2.2.4 Extraktion von DNA aus Bakterienlysat

Zur Verwendung in weiteren Experimenten (z.B. Sequenzierung, Klonierung, Transfektion) ist die Gewinnung von reiner DNA möglichst ohne Kontamination mit RNA und Protein notwendig. Dazu wurden nach Zentrifugation zu 500 µl bakteriellem Zellysat 500 µl Phenol:Chloroform hinzugegeben. Anschließend wurde das Zentrifugenröhrchen mehrfach invertiert und 1 Minute lang zentrifugiert. Es erfolgt eine Auftrennung in eine wässrige Phase oben (mit darin gelösten Nukleinsäuren), einer Interphase mit Proteinpräzipitat und einer phenolischen Phase (mit fettlöslichen Bestandteilen) darunter. Die wässrige Phase wurde vorsichtig in ein neues Zentrifugenröhrchen übergeführt. Zum gewonnenen Überstand wurden 1 µl Glykogen und 500 µl Isopropanol gegeben, was nach kräftigem Schütteln zu einer Präzipitation der Nukleinsäuren führte. Durch Lagerung bei -20°C für 30 min. konnte die Präzipitation verstärkt werden. Nach Zentrifugation (30 min., $>5000\text{ g}$) und Dekantieren des Überstandes wurde das Pallet mit 300 µl Ethanol gewaschen, zentrifugiert, der Ethanolüberstand dekantiert und anschließend in einem Thermoblock getrocknet.

Die Resuspension erfolgte durch Aufnahme in 50 µl TE- Puffer unter Hinzugabe von $\frac{1}{2}$ µl RNase A zur Digestion der ebenso extrahierten RNA. Statt TE –Puffer wurde gelegentlich TES Puffer verwendet.

Mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit [®] kann nach Anweisung des Herstellers methodisch äquivalent DNA mittels alkalischer Lyse gewonnen werden. Die Phenol:Chloroform Extraktion

und die Fällung mit Isopropanol sind bei dieser Methode redundant, weil mittels einer speziellen silikatartigen Gel-Membran in Säulen die DNA bei Anwesenheit chaotroper Salze adsorbiert wird und anschließend mit einem salzarmen Puffer eluiert werden kann. Dieses Kit wurde verwendet, wenn hochreine DNA für Sequenzierung oder weitere Klonierung benötigt wurde. Die erwartete Ausbeute beträgt 20 µg DNA.

Wurde nach Analyse ein bakterieller Klon ausfindig gemacht, der die Zielvorgaben erfüllte, erfolgte die weitere Expansion von 1 ml der entsprechenden Bakterienkultur nach Beimpfung von 200 ml LB-Medium und Bebrütung bei 37°C über Nacht. In Analogie zu den oberen Ausführungen erfolgte im Anschluss daran eine Präparation der Bakterien mittels alkalischer Lyse mit einem QIAGEN Plasmid Maxi Kit[®], welches eine Ausbeute von bis zu 500 µg DNA ermöglicht.

Die Präparation von BAC- Plasmid- DNA erfolgte durch Zentrifugation (3 min, 1000g) von 10 ml Bakterienkultur (LB-Medium, Über Nacht Kultur), Resuspension in 1 ml S1-Lösung unter Zugabe von 10 µl RNase A, alkalischer Lyse mit 1 ml S2-Lösung und nach 5 Minuten Neutralisierung mit 1 ml S3-Lösung. Nach Kühlung für 15 min. bei 4°C erfolgte eine erneute Zentrifugation für 10 min, und im Anschluss daran eine Extraktion der DNA mit Phenol:Chloroform und DNA-Fällung mit Isopropanol (91).

2.2.5 Mutagenese von MCMV-BAC mit homologer Rekombination in E.coli

In Laborstämmen von E. coli ist RecA (Rekombinase A) Funktion üblicherweise inaktiviert, um die Stabilität klonierter Sequenzen zu erhöhen. Die RecA vermittelte Rekombination bedarf zum einen homologe, flankierende Sequenzen von ca. je 2000 bis 3000 bp, zum anderen die Anwesenheit von Chi Erkennungsstellen (5'-CCTGGTGG-3') (114). Bei der hier verwendeten Methode wurde der Bakterienstamm CBTS verwendet (hergestellt durch M. O'Connor, University of California, Irvine, USA), welcher temperaturabhängig RecA⁺ bei 30°C und nahezu RecA⁻ bei >37°C ist. Damit lässt sich durch die Wahl geeigneter Temperaturbedingungen die

Rekombinasefunktion ein- und ausschalten. Das Wachstum von *E. coli* ist bei 30°C bzw. 42 °C nur attenuiert, jedoch nicht inhibiert.

Als Shuttle- Plasmid wurde pMBO verwendet, welches ein Tetrazyklin-Resistenzgen (pMBO96-tet) (116) enthält. Zuvor wurde die gewünschte Mutation in die HindIII Schnittstelle des Shuttle-Plasmids kloniert.

MCMV lag als BAC kloniert in *E. coli* vor (Stamm CBTS; mit Chloramphenicol- Resistenz). Der verwendete MCMV-Stamm war MCMV-BAC pSM3fr.

- a) Rekombination I. Mit Elektroporation wurden 100 ng pMBO (mit der gewünschten Mutation) in *E. coli* (Stamm CBTS; mit MCMV-BAC) transformiert, ausplattiert und bei 30°C (RecA+) über 24 Stunden bebrütet. Das Wachstum erfolgte auf LB- Agar, getränkt mit Tetrazyklin (abgekürzt tet; 10µg/ml) und Chloramphenicol (abgekürzt cam; 12,5 µg/ml). Bei einem Teil der Klone erfolgte eine Integration des Shuttle- Plasmids in das MCMV-BAC mittels homologer Rekombination. Abbildung 4 A.
- b) Selektion I. Nach einem Verdünnungsausstrich einzelner Kolonien erfolgte die Bebrütung bei 42°C (RecA-) über 24 Stunden (LB- Agar, tet und cam Resistenz). Ausschließlich Bakterien, bei denen eine Ausbildung von Kointegraten stattgefunden hat, bilden Kolonien. Abbildung 4 B.
- c) Testpräparation I. Es erfolgte eine Präparation der DNA von gepickten und in LB-Medium expandierten Kolonien (42°C; 24 h; tet, cam) und eine Bestätigung der Kointegration mittels Restriktionsenzymverdau.
- d) Rekombination II. 200 ml LB-Medium (cam) wurden mit 5 ml Bakterienlösung (mit Kointegrat) angeimpft und bei 30°C über 24 h bebrütet; von dieser Kultur wurden an 10 LB- Agarplatten (cam) Verdünnungsausstriche angefertigt und bei 30°C über 24 h bebrütet. Abbildung 4 C und D.

- e) Testpräparation II: Test auf homologen Austausch. 500 Kolonien wurden auf je 2 Platten numerisch identifizierbar umgepickt. Hierbei wurden die Bakterien zuerst auf die LB- Agarplatte (tet) und anschließend auf die LB- Agarplatte (cam) gebracht.
- f) Weitere Tests. Von tet- sensitiven Kolonien wurde DNA gewonnen und die erfolgte Rekombination überprüft

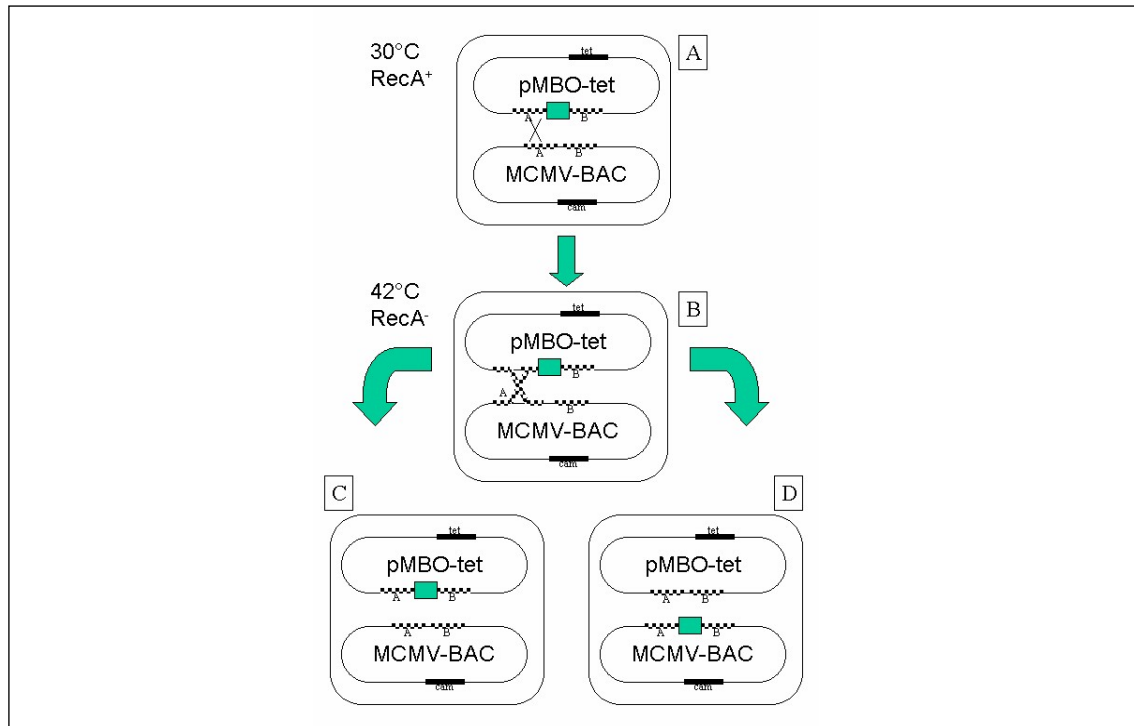


Abbildung 4. Homologe Rekombination in E. coli

A: Darstellung des 1. Schrittes der Rekombination bei 30°C. B: Auf tet/cam LB- Agar sind bei 42°C ausschließlich Kolonien mit Kointegrat vital. C/D: 2. Schritt der Rekombination: Es kann bei einer Auflösung des Kointegrates entweder wieder Wildtyp oder eine Mutante rekonstituiert werden. Plasmide schematisch vereinfacht; Größe entspricht nicht den tatsächlichen Längenverhältnissen.

2.2.6 Mutagenese von MCMV-BAC mit direkter Transposonmutagenese

Das Plasmid pTsTM16 wurde in E. coli mittels Elektroporation transformiert, in welchem MCMV als BAC kloniert vorliegt (Stamm MCMV-BAC SM3fr). MCMV- BAC trägt ein Resistenzgen für Chloramphenicol (cam). pTsTM16 trägt eine Resistenzgen für Kanamycin (kan)

und für Ampicillin (amp), wobei das Ampicillin-Resistenzgen nur bei Kultivierung bei 30° transkribiert wird. Die gesamte Transposition erfolgte in zwei Schritten:

- a) Transposition. Nach Transformation wurden die Bakterien auf eine mit cam und amp getränkten LB-Platte bei 30°C über 24 h kultiviert. Bei einem Teil der Klone erfolgt die Transposition in das MCMV-BAC-Plasmid, wobei erwartet wird, dass die Insertionsstelle grundsätzlich zufällig ist.
- b) Selektion. Nach einem Verdünnungsausstrich einzelner Kolonien erfolgte die Bebrütung bei 42°C über 24 Stunden (LB- Agar, kan und cam Resistenz). Ausschließlich Bakterien, bei denen eine Transposition stattgefunden hat, bilden Kolonien.
- c) Kontrolle. Von den koloniebildenden Bakterien wurde DNA gewonnen und mittels einer Restriktionsenzymanalyse wurde geprüft, ob eine Transposition stattgefunden hat.
- d) Sequenzierung. MCMV-BAC DNA konnte einer direkten Sequenzierung zugeführt werden, weil das Transposon mit Bindungsstellen für M13forward und M13reverse Primer ausgestattet ist (Sequenzierung durch Fa. Medigenomix, Martinsried).

2.3 Molekularbiologie

2.3.1 Restriktionsenzymverdau

Rekombinant hergestellte und kommerziell erhältliche Endonukleasen erkennen spezifische DNA Sequenzen von 4,5,6 oder mehr Basenpaaren Länge und führen in dieser Sequenz zu einer Spaltung der DNA. Damit können z.B. Plasmide linearisiert oder in mehrere Fragmente geschnitten werden, um sie mittels Gel- Elektrophorese analysieren zu können. Der Verdau erfolgte den Vorgaben der Hersteller entsprechend mit der Wahl der richtigen Konzentration an DNA und Enzym, des adäquaten Puffers und der passenden Inkubationstemperatur. Exemplarisch sei hier der Verdau mit EcoRI detailliert dargestellt: Zu 0,5 µg Plasmid DNA (z.B. 5 µl) wurden 2 µl 10-fach Puffer NEB EcoRI (New England Biolabs) und 1 µl EcoRI (New England

Biolabs, 20.000 U/ μ l) hinzugegeben, die Lösung anschließend mit aq. dest. auf 20 μ l aufgefüllt und in einem Thermomixer bei 37°C über 60 min. inkubiert. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Fragmente mittels Gelelektrophorese.

2.3.2 Partieller Restriktionsenzymverdau mittels Enzymverdünnung

Unter Umständen kann es für die weitere Klonierung notwendig sein, dass eine Spaltung der DNA nicht an allen Erkennungsstellen erfolgt. Wird der Ansatz mit nur wenig Enzym durchgeführt und nach kurzer Zeit gestoppt, kann erwartet werden, dass nicht alle Spaltungen vollständig erfolgt sind. Hierfür wurden 100 μ l Reaktionsmischung (10 μ g DNA, 10 μ l 10-fach Puffer aq. dest. ad 100 μ l) in 5 Reaktionsgefäße aufgeteilt (30 μ l, 3x20 μ l, 10 μ l) und bei 4°C gekühlt. 10 U Enzym pro eingesetztes μ g DNA wurden in das Gefäß mit 30 μ l gegeben und gut durchmischt. Anschließend erfolgte eine Verdünnung durch Weiterreichen von jeweils 10 μ l Mischung (Verdünnungsstufen: 1:1; 1:3; 1:9; 1:27; 1:54) in das darauffolgende Gefäß. Die Gefäße wurden gleichzeitig für 15 min. bei 37°C inkubiert und das Enzym wurde im Anschluss an die Inkubation bei 65°C für 20 min. inaktiviert.

2.3.3 Klenow- Enzym Reaktion

Das Klenow- Enzym als großes Fragment der DNA- Polymerase I, besitzt nur die 5' \rightarrow 3'- Polymerase- und die 3' \rightarrow 5'-Exonuklease- Aktivität, während die 5' \rightarrow 3'- Exonuklease- Aktivität des ursprünglichen Enzyms nicht mehr vorhanden ist. Das Klenow- Enzym katalysiert die Anlagerung von Mononukleotiden aus Desoxynucleosid-5'-triphosphaten (dNTP) an das 3'-OH- Ende einer Primer/ Template- DNA (147). Die Anwendung der Klenow- Reaktion kann sinnvoll sein, wenn eine Ligation nicht komplementärer DNA-Enden bei einer Klonierung notwendig ist. Der Inkubationsansatz in 50 μ l Ansatzvolumen erfolgte mit 5 μ l dNTP (10 mM), 5 μ l Klenow- Puffer (10 -fach, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim), ca. 40 μ g DNA (40 μ l) und 2 Einheiten

Klenow- Enzym (1µl). Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 30 min., gefolgt von einer Inaktivierung des Klenow- Enzyms bei 69°C für 30 min.

2.3.4 Gelelektrophorese in Agarosegel

Zur Darstellung der klonierten / extrahierten DNA erfolgte die Auftrennung mittels Gelelektrophorese in Agarosegel. Durch Interkalation von Ethidiumbromid und DNA kann diese unter UV-Licht (300 nm) sichtbar gemacht werden. Weil durch die Visualisierung bei 300 nm photobleichende Effekte resultieren und DNA Strangbrüche die Folge sein können, erfolgte die Visualisierung von DNA zur weiteren Präparation unter 254 nm UV – Licht. Die sichtbaren Banden wurden fotografiert und auf Fotopapier gedruckt. Die Konzentration des Agarose- Gels wurde in Abhängigkeit von der erwarteten Bandengröße gewählt: 0,3 % bei 5-60 kb, 0,8 % bei 1-10 kb und 2 % bei 0,1-3 kb. Die Agarose wurde mit 100 ml TAE-Puffer vermischt und in einer Mikrowelle bei 90°C gelöst. Nach Abkühlen auf 45-50°C wurde 1 µg/ml Ethidiumbromid hinzugefügt und die Agarose in die Elektrophoreseschale gegossen. Nach Festwerden wurde das Gel in die mit TAE Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt und pro Tasche wurden ca. 10-500 µg DNA gegeben (10 µl DNA-Lösung und 3 µl Ladepuffer). Die Auftrennung der polyanionischen DNA erfolgte durch Anlage einer 110 V Gleichstromspannung bei 100 mA. Die Dauer der Auftrennung ist abhängig von der Größe der DNA-Fragmente: 1-10 kb: 1 Stunde; 10-30 kb: 18 Stunden. Für die 18 Stunden- Gele wurde TAE durch TBE ersetzt. Sollte die DNA aus einer Bande weiterverwendet werden, so wurde diese unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Agarose- Gel herausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit ® nach Vorgabe des Herstellers extrahiert.

2.3.5 Ligation von DNA Fragmenten an geöffnete Vektoren

Die T4 DNA Ligase katalysiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung benachbarter 5' Phosphat- und 3' Hydroxylenden in doppelsträngiger DNA. Man kann mit der T4 DNA Ligase

gerade DNA Enden ohne Überhang und kohäsive Enden verbinden (128). Die T4 DNA Ligase benötigt ATP, welches im entsprechenden kommerziell erhältlichen Puffer bereitgestellt wird. Für einen Ansatz (Ansatzvolumen 20 µl) wurde versucht, 0,1 µM bis 1µM Vektor DNA zur Verfügung zu stellen. Das Insert wurde in mehrfach höherer Konzentration bereitgestellt: 2 µl Vektor-DNA, 7 µl Insert- DNA, 2 µl Ligase- Puffer, 1 µl Ligase (40.000 U/ml) aq. dest. ad 20 µl. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Anschließend wurde durch Zugabe von 20 µl Phenol:Chloroform die DNA vom Protein abgetrennt und die wässrige Phase auf einem MF- Millipore® Membranfilter gegen destilliertes Wasser 45 min. lang dialysiert. Anschließend konnte eine Transformation von Bakterien mit der dann salzfreien DNA erfolgen.

2.3.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR erfolgte nach Vorgaben des Herstellers. Im PCR Reaktionsgefäß (Ansatzvolumen 50 µl bzw. 100 µl) wurden je 10 pmol Primer (1 µl), 5 bzw. 10 µl 1:10 Puffer, 4 µl 10 mM dNTP- Mix und 0,75 U Taq- Polymerase gegeben. Es erfolgte ein Ansatz mit unterschiedlichen Template-Konzentrationen in Verdünnungsstufen von 1:2, 1:5 und 1:50. Die Magnesiumchloridmenge wurde ebenfalls unterschiedlich titriert: 0,5 mM, 1,0 mM, 1,5 mM, 2,0 mM, 2,5 mM.

Temperaturprofil und Amplifikation mit 35 Zyklen nach Initialdenaturierung (5 min bei 95°C):

Denaturierung : 30 sec (95°C); Annelierung: 30 sec (57°C); Amplifikation: 54 sec (72°C)

Bei Amplifikation zu Klonierungszwecken wurde die Zahl der Zyklen auf 30 reduziert.

2.3.7 Quantitative PCR mit TaqMan™ Technologie

Die TaqMan™ Technologie nutzt das Prinzip des homogenen Assays, bei der Amplifikation und der Nachweis des PCR Produktes simultan in einem Reaktionsgefäß ermöglicht wird. Sie nutzt die 5'-3' Exonukleaseaktivität der DNA Polymerase zur Hydrolyse einer eines DNA- Oligomers (Reportersonde), welches an dessen 5' Ende einer fluorogener Farbstoff (FAM: 6-Carboxy-Fluorescein) kovalent gebunden ist (70). Im polymerisierten Zustand wird die Fluoreszenz durch

die räumliche Nähe des Quenchers (TAMRA: 6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin) verhindert, welcher an das 3'-Ende der Reportersonde als Ersatz für ein terminales T synthetisiert wurde. Durch Registrierung des so entstehenden Fluoreszenzspektrums online lässt sich die Menge an Genäquivalenten quantitativ erfassen. Durch die Verwendung von zwei verschiedenen Reportersonden mit unterschiedlichen fluorogenen Farbstoffen mit unterschiedlichem Fluoreszenzverhalten (FAM; VIC) können zwei Amplifikate gleichzeitig hergestellt und analysiert werden. Für MCMV erfolgte die Amplifikation eines Abschnittes des Exon 4 des *ie1* Gens mit 21-mer Primern (FAM- Reporter). Als zelluläres Kontrollgen wurde ein Abschnitt vom Gen des murinen Glutamatrezeptors 1 (*glra1*) mit 20-mer Primern vervielfältigt (VIC- Reporter).

Die Reaktion erfolgte in 30 µl Reaktionsvolumen mit 15 µl TaqMan Universal PCR Mastermix, jeweils 6 pmol Primer und Reportersonde und 5µl Template- DNA in einem ABI 7700 DNA-Analysator als 2-Schritt PCR. Temperaturprofil und Amplifikation mit 45 Zyklen nach initialer Denaturierung (10 min bei 95°C): Denaturierung 15 sec (95°C); Annelierung und Amplifikation 60 sec (60°C). Die Quantifizierung erfolgte durch Vergleich mit einer zu jedem Ansatz neu ermittelten Standardkurve, die durch serielle Verdünnung von bakterieller DNA bzw. von DNA aus murinen Zellen erstellt worden war. Für die Negativkontrollen diente DNA von nicht infizierten Zellen bzw. es erfolgten Reaktionsansätze ohne Hinzugabe von Template.

2.4 Eukaryontische Zellkultur

2.4.1 Kultur von NIH 3T3 Fibroblasten und murinen embryonalen Fibroblasten

Murine embryonale Fibroblasten (MEF) von BALB/c Mäusen wurden in Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium (DMEM) kultiviert, welches mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS) versetzt wurde. NIH 3T3 Fibroblasten wurden in DMEM Medium kultiviert, welches mit 5 % Serum von neugeborenen Kälbern (NCS) versetzt wurde.

Die Passagierung erfolgte durch Absaugen des Mediums und überschichten der Zellen mit 0,1 Trypsinlösung, anschließend sofortigem Wiederentfernen der Lösung und Inkubation bei 37°C für 5 min.. Danach wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und im Verhältnis von 1:3 in neue Zellkulturschalen umgesetzt.

Zur Lagerung in flüssigen Stickstoff wurden Zellen 24h nach der letzten Passagierung trypsinisiert, in DMEM Medium resuspendiert, abzentrifugiert (350g) und in 4° kaltem Einfriermedium (mit 10% DMSO) resuspendiert. Anschließend erfolgte eine stufenweises Abkühlen durch Lagerung bei -20°C (4h) und -70°C (24h) und Verbringen in flüssigen Stickstoff. Der Auftauvorgang erfolgte in einem 37°C Wasserbad.

2.4.2 Rekonstitution von Virus

Die Rekonstitution von mittels homologer Rekombination hergestellten MCMV-Mutanten und von Wildtyp-MCMV erfolgte durch Transfektion von BAC-DNA mit dem Superfect Transfection Reagent™ (STR) nach Angaben des Herstellers. Dazu wurden 5 µg BAC-DNA mit 100 µl DMEM-Medium und 10 µl STR inkubiert und der Dendrimer-DNA-Komplex auf 3×10^5 NIH-3T3 Fibroblasten gebracht. Nach 4 Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen und wie üblich kultiviert. Die Rekonstitution von MCMV-Transposon-Mutanten erfolgte durch unmittelbare Inokulation von NIH-3T3-Zellen (24 h nach letzter Passage) mit einem invasiven E. coli-Stamm. Dazu wurden 50 µl einer Übernacht-Bakterienkultur (LB-Medium) auf die Zellen gebracht und bei 350 g für 3 Minuten zentrifugiert und anschließend 90 Minuten lang inkubiert. Anschließend wurden Medium / Bakterien abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit frischem DMEM Medium für weitere 48 h kultiviert.

Für die Herstellung von Virus-Stammlösungen wurden Zellen infiziert und bei Vorliegen eines weitgehend vollständigen zytopathologischen Effektes die Fibroblasten mit einem Zellschaber von der Kulturschale abgeschabt. Der Überstand mit den Zellen wurde in Zentrifugenröhrchen aufgenommen. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 500 g in einer Kühlzentrifuge (15°C) und die

Resuspension des Pellets in 2 ml DMEM Medium. Anschließend wurden die Zellen in einem Homogenisator nach Dounce durch 10-20-maligen Kolbenhub aufgeschlossen und bei 1000g bei Raumtemperatur für 10 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde in 100 µl Portionen aliquotiert und bei -70°C gelagert. Die Virusmenge im Stock wurde mittels Titration von NIH-3T3 Fibroblasten in 96-well-Platten in PFU quantifiziert. Jede Quantifizierung erfolgte im Triplikat.

2.4.3 Semiquantitative licht- und fluoreszenzmikroskopische Analyse des Wachstumsverhaltens von MCMV – Virusmutanten

NIH3T3 Fibroblasten wurden in 6-well Platten im Verhältnis 1:12 gesplittet und für 24 h in DMEM Medium ohne Zugabe von Antibiotika im Zellkultur-Brutschrank bei 37°C kultiviert. 1 ml LB-Medium (unter Zugabe von Kanamycin und Chloramphenicol) wurde mit E. coli des Stammes DH10b (mit [mutiertem] MCMV-BAC und Invasionsplasmid) inokuliert und bei 42°C über 24 h unter hoch sterilen Bedingungen (keine Glasware, autoklavierte Einwegartikel, sterile Handschuhe) expandiert. 10 µl dieser Bakterienkultur wurden nochmals über 24h in 1 ml LB-Medium expandiert, um die Menge an Bakterieninokulat für alle Stämme konstant zu halten. 50 µl dieser bakteriellen Übernacht-Kultur wurden unmittelbar auf die NIH3T3 Fibroblasten gegeben und die Zellen für 3 min bei 350 g zentrifugiert; anschließend wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, die Zellen wurden mit PBS gewaschen und neues Medium wurde hinzugegeben.

Jede Schale wurde in 10 Sektoren unterteilt und der zytopathologische Effekt wurde jeweils nach 96 Stunden unter dem Lichtmikroskop (plaque, Abk. PL) sowie unter dem Fluoreszenzmikroskop (cell cluster, Abk. CC; isolated infected cell, Abk. IIC) für jeden Sektor isoliert beurteilt. Nach 96 h Stunden wurden die Zellen im Verhältnis 1:6 gesplittet, für weitere 48 h inkubiert und der zytopathologische Effekt wurde erneut beurteilt (144 Stunden-Wert). Es erfolgte eine weitere

Passagierung der Zellen, eine dritte Inkubation für 72 Stunden und die erneute Beurteilung (216 Stunden-Wert).

2.4.4 Quantitative Aussagen zur MCMV-Replikation: Wachstumskurven an Fibroblastenkulturen

Am Tag vor Infektion wurden Zellen in 6-well Platten in Verhältnis 1:8 gesplittet. Etwa $1-6 \cdot 10^5$ NIH 3T3 Fibroblasten wurden mit einer MOI von 0,1 PFU/Zelle (MOI = multiplicity of infection) mit MCMV inokuliert. Nach 2 Stunden wurde das Medium abgenommen, die Zellen wurden mit PBS gewaschen und neues Medium wurde hinzugefügt. 4 und 7 Tage p.i. wurde der Überstand aliquotiert und mittels eines Plaque- Assays auf 3T3-Fibroblasten gemäß (127) quantifiziert. Hierfür wurden jeweils am Tag vor einer Aliquotierung der Überstände 96-well Platten mit 1:12 gesplitteten Zellen angesetzt. Jede Quantifizierung erfolgte im Triplikat.

2.4.5 Zuordnung der Genexpression von MCMV-Insertionsmutanten zu den MCMV-Expressionsphase

Zum Nachweis der Sekretion der Marker-Proteine in vitro wurden frische Fibroblastenkulturen (1:6 passagiert; 24 h bebrütet) in 6-well Platten mit einer gereinigten, titrierten Viruspräparation mit einer MOI von 1,0 infiziert. Nach zweifacher Zentrifugation (2 x 15 min; 350 g) wurde das Medium mitsamt dem überschüssigen Virus abgewaschen (Zeitpunkt 0 Stunden). Anschließend wurden vom Kulturüberstand Aliquots von 200 µl nach 3, 8, 16, 24, 32 und 40 Stunden entnommen („late“- Expression). Für die „immediate early“ Expression wurden die Zellen vor Infektion mit frischem Medium mit 50 µg/ml Cycloheximid behandelt (1h Inkubation); nach der Infektion und Zentrifugation wurde erneut Cycloheximid-haltiges Medium hinzugegeben (0 Stunden-Wert) und die Zellen für drei Stunden bebrütet. Anschließend wurden 10 µg/ml Actinomycin D hinzugegeben (3-Stunden-Wert), 1 Stunde inkubiert, das Medium abgesaugt und durch neues Medium mit Actinomycin D aber ohne Cycloheximid ersetzt (4-Stunden-Wert).

Vom Überstand wurden Aliquots von 200 µl nach 4 weiteren Stunden (8-Stunden-Wert) sowie nach 16 Stunden abgenommen. Für die „early“- Expression wurden die Zellen vor Infektion mit frischem Medium mit Phosphonoacetat behandelt (1h Inkubation); nach der Infektion und Zentrifugation wurde erneut Phosphonoacetat-haltiges Medium hinzugegeben (0 Stunden – Wert) und die Zellen bebrütet (Aliquots nach 6,12 und 18 Stunden). In den aliquotierten Medien wurde jeweils der Gehalt der sezernierten Proteine quantifiziert. Als Negativkontrolle wurden die Überstände des jeweils anderen Virus verwendet (MCMV-HBsAg, MCMV-SEAP).

2.4.6 Direkte elektronenmikroskopische Visualisierung von in viro infizierten Fibroblasten

NIH 3T3 Fibroblasten wurden im Verhältnis 1:12 gesplittet und in einer 6-well Platte über 24 h bebrütet. Von einer Schale wurden die Zellen abgelöst und in einer Zählkammer quantifiziert. In den übrigen Schalen wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit Virus infiziert. Nach Infektion mit Virus (MOI 0,1) wurden die Zellen für weitere 96 Stunden im Brutschrank kultiviert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, die Zellen wurden mit 1 ml PBS und anschließend mit 2 x Na-Kakodylat-Puffer gewaschen und dann ohne Trypsin vorsichtig abgelöst, in 1 ml 0,1 M Na-Kakodylat-Puffer aufgenommen und durch Zugabe von 100 µl 25% Glutaraldehyd fixiert (24 h; 4°C).

Die weitere Prozessierung und Einbettung erfolgt nach den üblichen Protokollen (13), (14). Zur besseren Kontrastierung und Streuung von emmitierten Elektronen zur transmissionselektronischen Darstellung von MCMV in infizierten Zellen erfolgte die Kontrastierung mit Uranylacetat. Orientierende Darstellungen wurden an Semidünnschnitten (ca. 1 µm) durchgeführt, die Visualisierung einzelner Zellen erfolgt an 50 nm - Dünnschnitten. Die Einbettung, die Fixierung und die EM-Darstellung erfolgten in Kooperation durch Prof. Dr. H. Bartels, Lehrstuhl II (Direktor: Prof. Dr. U. Welsch), Anatomische Anstalt der Ludwig-Maximilians-Universität München.

2.4.7 Zellkompartimentierung in zelluläre und nukleäre Fraktion

Zur Quantifizierung der intrazellulären MCMV-Menge im Nukleus bzw. im Zytosol erfolgte eine Auftrennung von Zellen in die zytosolische Fraktion C und die nukleäre Fraktion N und im Anschluss daran eine DNA-Extraktion und eine Quantifizierung mittels quantitativer PCR. Hierfür wurde bei NIH3T3 Fibroblasten, welche mit MCMV infiziert worden sind (MOI 0,1) nach 96 Stunden Bebrütung das Medium abgesaugt, die Zellen wurden mit PBS gewaschen, vorsichtig abgeerntet, bei 350 g abzentrifugiert, mit PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und anschließend in CN-Puffer resuspendiert und für 5 min. bei 4 °C gekühlt. Es erfolgte die Zentrifugation bei 1500 g über 15 Minuten bei 4 °C und die Auftrennung von Überstand (Fraktion C) und Pellet (Fraktion N). Anschließend erfolgte eine DNA Extraktion mit Phenol:Chloroform und Isopropanol / Ethanol unter Zugabe von 50 µg/ml Proteinase K. Für die Gewinnung von gesamtzellulärer DNA wurde das Blood & Cell Culture DNA Mini Kit® (Qiagen) nach Vorgaben des Herstellers verwendet.

2.5 Automatisierte Quantitative Nachweisverfahren: Quantifizierung von HBsAg und SEAP

HBsAg: Die Detektion von HBsAg in Zellkulturüberständen erfolgte mittels Chemilumineszenz auf einem für HBsAg geeichten Elecsys® 1010 Analysator nach Vorgaben des Herstellers. Hierfür wurden jeweils 100 µl Zellkulturüberstand eingesetzt. Die Einheit bei Quantifizierung ist $\log_{10}\text{COI}$ und entspricht dem dekadischen Logarithmus der Signalmenge oberhalb des Cut-Off-Index. Die Detektion von HBsAg in murinen Seren erfolgte mittels des ORTHO® HBsAg System 2 nach Vorgaben des Herstellers (50 µl murines Serum).

SEAP: Die Detektion von SEAP sowohl in Zellkulturüberständen als auch in murinen Seren erfolgte mit dem Clontech Great EscAPe™ SEAP Chemoluminescence Detection Kit nach Vorgaben des Herstellers. Die Auswertung erfolgte in dunkelwandigen 96-well-Platten unter

Verwendung eines Multiwell-Fluoreszenz-Plattenlesegerätes (Technische Einstellungen: Count-time 0,1 min, 0,2 min; Count-termination: no; Count-delay: 0,02 min). Die Quantifizierung erfolgte mittels einer Standardkurve über 6 Potenzen, die an hochreiner SEAP erstellt wurde. Die zur Quantifizierung verwendete Einheit sind CPS (counts per second) bzw. AU (arbiträre Einheiten) als ein Vielfaches der CPS, wobei die Negativkontrolle den AU-Wert von 1 erhielt. Als Negativkontrollen diente jeweils Zellkulturmedium bzw. Überstand von infizierten Zellen mit Wildtyp-MCMV sowie Serum von nichtinfizierten bzw. Wildtyp-infizierten Mäusen.

2.6 Tierexperimentelle Verfahren

Sämtliche Aufzucht von Versuchstieren, die Infektionen von Versuchstieren, die Blutentnahmen und die Bestimmungen von Virustitern in Tierorganen von Versuchstieren erfolgten in Kooperation durch Milena Hasan, Dr. Ivan Bubic und Prof. Dr. Stipan Jonjic an der Abteilung für Histologie und Embryologie der Medizinischen Fakultät der Universität Rijeka, Kroatien unter Berücksichtigung der Regularien der örtlichen Behörden.

Die Messung von HBsAg – Menge bzw. SEAP – Aktivität erfolgte wie unter 2.5 beschrieben. Die quantitative PCR an murinen Seren erfolgte in Analogie zu der unter 2.3.7 beschriebenen Methode.

Infektion mit MCMV. 100.000 PFU von MCMV-Wildtyp-Virus bzw. MCMV-Insertionsmutante wurden in 500 µl PBS gelöst und in 6 Wochen alte BALB/c Mäuse intraperitoneal (i.p.) injiziert. Alternativ wurden 10^5 PFU in 50 µl PBS gelöst und in den hinteren Lauf injiziert.

Gewinnung von Blut und murinem Gewebe. Die Gewinnung von Blut erfolgte aus der Schwanzvene bzw. dem orbitalen Plexus nach Standardprotokollen wie sie in (24) beschrieben worden sind. Zur Vergleich der Proteinsekretion mit den Virustitern in Organen wurden die Tiere am Tag 7, 14 bzw. 21 getötet und dann die Organtiter bzw. die Proteinmengen bestimmt.

Immunsuppression von BALB/c Mäusen. Die schwere Immunsuppression erfolgte durch die Applikation einer subletalen Ganzkörper-- γ -Bestrahlung als Einzeldosis von 6 Gy vor der Virusinfektion. Zur selektiven in vivo Depletion der CD4-positiven T-Lymphozyten wurden monoklonale Antikörper (Ratte) gegen murines CD4 entsprechend den Vorgaben in (75) intraperitoneal injiziert (Antikörper YTS 191,12).

3. ERGEBNISSE

3.1 MCMV mit sezernierbaren Reporterproteinen

3.1.1 Konzept und Strategie

Da die Speziespezifität von CMV eine experimentelle Infektion von Versuchstieren mit HCMV ausschließt, wird seit geraumer Zeit das murine Zytomegalievirus (MCMV) als ein Modellsystem für die Analyse der CMV-Infektion im natürlichen Wirt verwendet. Nach Inokulation des Versuchstieres lässt sich der Verlauf der akuten MCMV-Infektion und der Reaktivierung durch die Bestimmung von Virus-Titern in den Organen ermitteln. Dies erfordert zum einen den Einsatz einer großen Anzahl von Versuchstieren, zum anderen besteht keine Möglichkeit einer intraindividuellen Betrachtung, weil bis dato MCMV keinen Marker sezerniert, welcher quantifiziert werden kann.

Das Konzept war daher, ein Gen für ein sezernierbares Marker-Protein in das MCMV-Genom einzufügen. Mit Hilfe der sezernierten Marker könnte möglicherweise Virusaktivität artunabhängig, unkompliziert und quantitativ durch die Analyse der Serumproben infizierter Mäuse messbar werden. Damit ließe sich möglicherweise der Verlauf der Infektion in ein- und demselben Tier auf einfache Weise beobachten und quantifizieren.

Das Oberflächenantigen des humanen Hepatitis B Virus (HBsAg) kann mittels ELISA in Serumproben mit hoher Spezifität quantifiziert werden. Alternativ steht mit SEAP ein sezernierbares Enzym zur Verfügung, das nach Transfektion in Zellkulturen mit hoher Sensitivität quantifiziert werden kann (36). In dieser Arbeit wurde aus zwei bereitgestellten Plasmiden das Gen für HBsAg bzw. SEAP ausgeschnitten und in den *ie2*-Genlokus des MCMV Genoms, welches als BAC-Plasmid vorlag (103), mittels homologer Rekombination in *E. coli* kloniert. Abbildung 5.

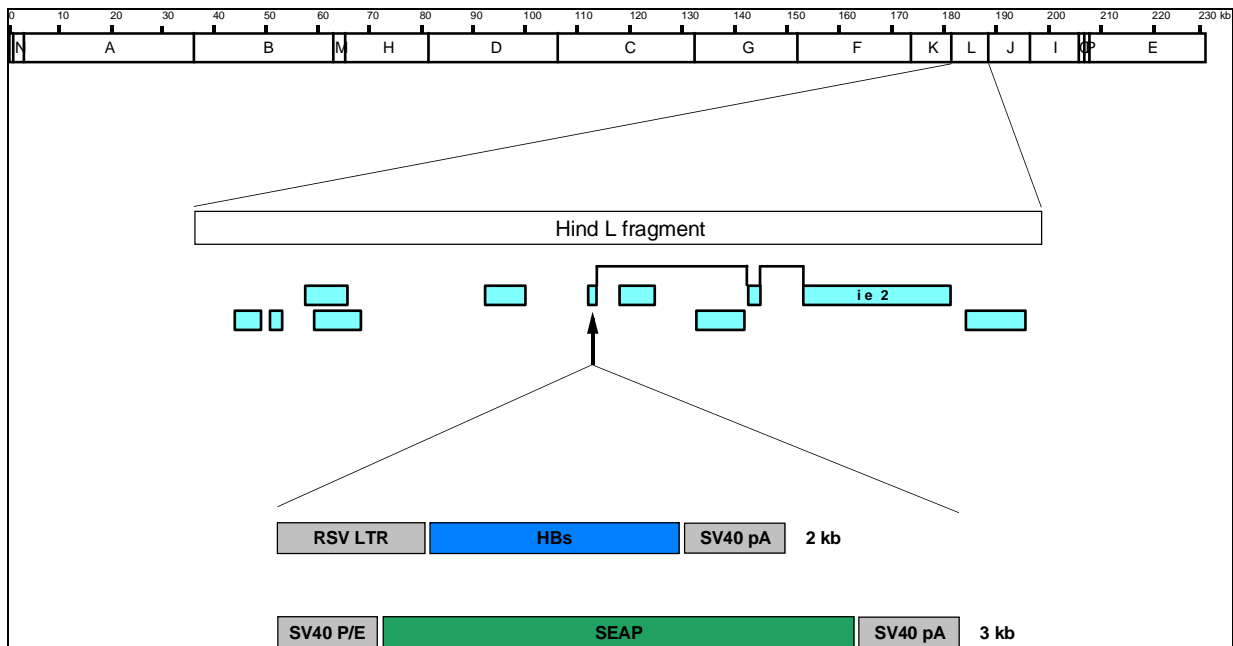


Abbildung 5. Insertion von Markergenen für HbsAg und SEAP ins MCMV Genom

oben: schematische Darstellung des gesamten MCMV-Genoms. Buchstaben bezeichnen die einzelnen HindIII-Fragmente. mitte: vergrößert das HindIII-L-Fragment mit Exon1 (Pfeil) des ie2-Gens. unten: Schematische Darstellung der Insertion: Das HBs- und das SEAP-Gen wurden zwischen zwei HpaI-Schnittstellen in das ie2-Gen innerhalb des HindIII- L-Fragmentes eingesetzt

3.1.2 Klonierung eines Rekombinationsplasmides mit HBsAg bzw. SEAP zur homologen Rekombination

Das Plasmid pSBC2-SEAP (37) wurde in *E. coli* mittels Elektroporation transfiziert, die Bakterien wurden anschließend expandiert und DNA wurde gewonnen. Die Integrität des Plasmides wurde mit einem Restriktionsenzymverdau mit EcoRI / EagI bzw. PvuI / ApaL1 und anschließender Agarosegel Elektrophorese bestätigt. Es erfolgte die Eröffnung von pSBC2-SEAP mit ApaL1 bzw. ApaL1 / PvuI, eine Glättung der Überhänge mit der Klenow- Reaktion und die Isolierung der SEAP enthaltenden Restriktionsfragmente (2900 bp bzw. 2550 bp).

Abbildung 6A: Die Fragmente wurden in einen mit HpaI eröffneten pACYC177 Vektor (108) kloniert, in dessen Kanamycin- Resistenzgen zuvor das HindIII-L Fragment von MCMV inseriert worden war.

Abbildung 6B: Die so erhaltenen Plasmide wurden anschließend mit HindIII gespalten. Weil sich innerhalb des SEAP Gens ebenso eine HindIII Schnittstelle findet, musste der Verdau lediglich partiell durchgeführt werden. Es ergaben sich dadurch Banden von 7943 bp, 10000 bp und 10349 bp. Die 10 kb Bande wurde isoliert, DNA extrahiert und anschließend an das Plasmid pMBO ligiert, welches zuvor mit HindIII eröffnet worden war.

Abbildung 6D. In Analogie hierzu wurde das Gen für HbsAg aus dem Plasmid pRep4 (74) mit Sall exzidiert und in das mit HindIII eröffnete pMBO- Plasmid integriert. Da sich die Überhänge nach Sall (5'G[^]TCGAC) und HindIII (5'A[^]AGCTT) nicht ähneln, mussten sie beim Insert und beim Plasmid vor der Ligation mit einer Klenow Reaktion geglättet werden.

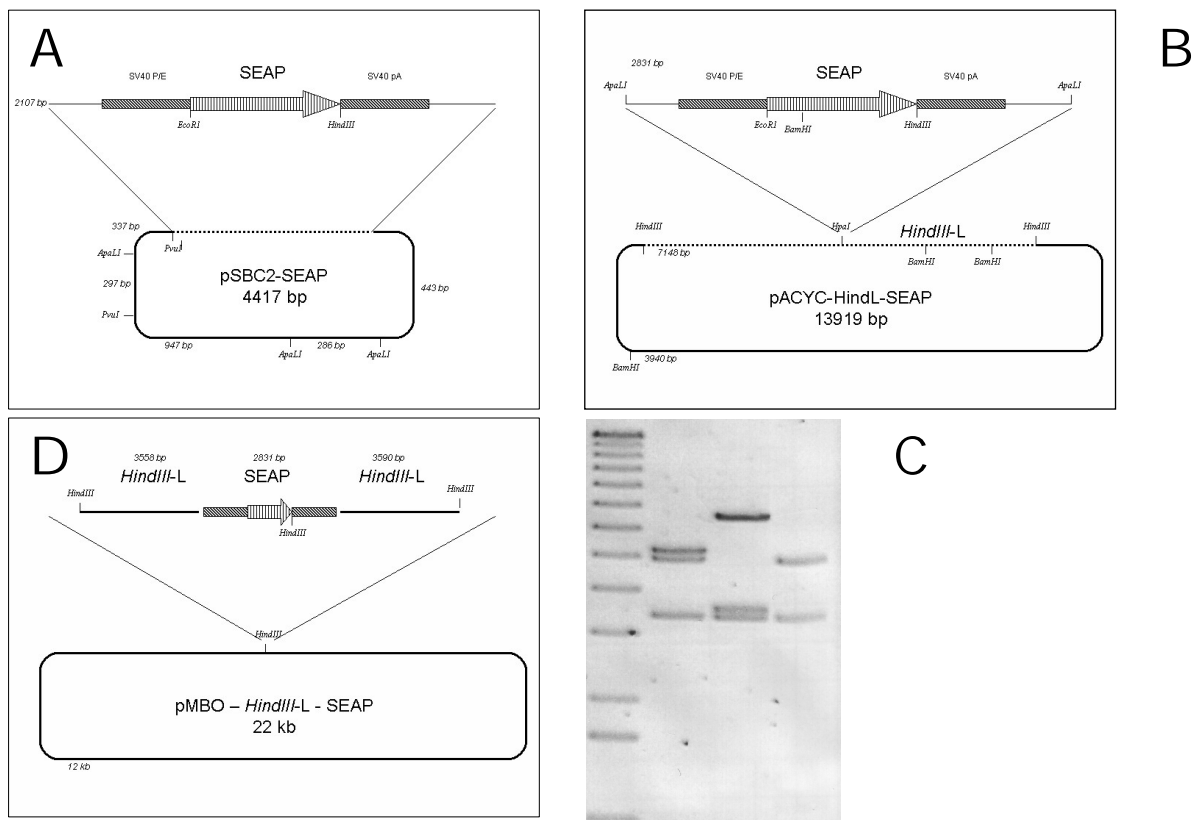


Abbildung 6. A. Schematische Darstellung des klonierten Plasmides pSBC-SEAP.

Abkürzungen: SV40 P/E: SV40 Promoter/Enhancer; SV40 pA: SV40 Polyadenylierungssignal.

B. Schema von pACYC-HindL-SEAP (SEAP wurde in die HpaI Schnittstelle des HindIII-L Fragments kloniert). C. Restriktionsmuster von pACYC-HindL-SEAP nach Verdau mit BamHI zeigt 3 Möglichkeiten: gleichgerichtete Insertion mit Banden bei 3408 bp, 4443 bp, 5530 bp (links), entgegengesetzte Insertion mit Banden bei 3408 bp, 3828kb, 6145 pb, (mittel) und ohne Insertion mit Banden bei 3408 bp, 7142 bp (rechts); Die 538 bp Bande des Hind-L-Fragments kommt nicht zur Darstellung. D. Schema von pMBO-HindIII-L-SEAP.

3.1.3 Mutagenese mittels homologer Rekombination in E.coli

Es erfolgte sodann die Mutagenese mit Hilfe von homologer Rekombination in E. coli durch Elektroporation des Shuttleplasmids in CBTS Bakterien, in welchen das MCMV-Genom als BAC kloniert vorlag. Bei 3 von 170 gepickten Kolonien konnte eine Mutation nachgewiesen werden. Abbildung 7. Die so hergestellten Mutantengenome wurden in NIH 3T3 Fibroblasten transfiziert und Virus wurde erfolgreich rekonstituiert.

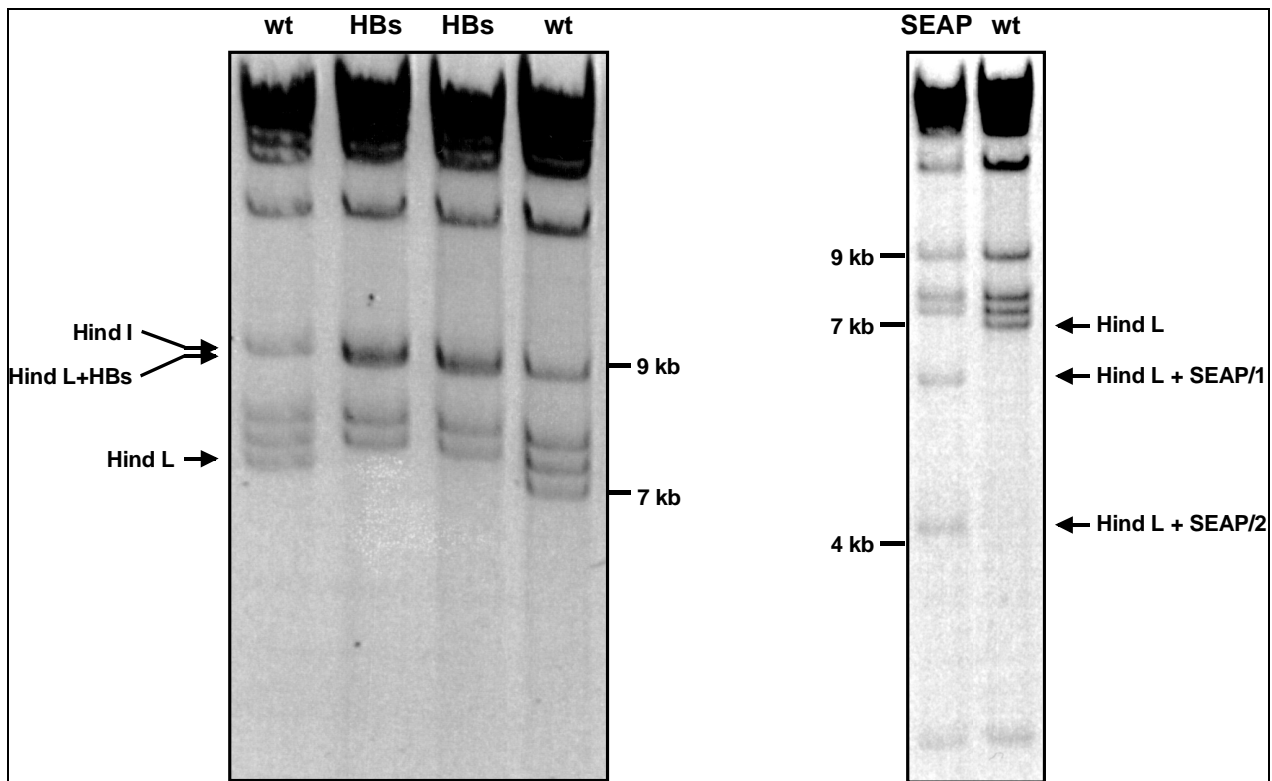


Abbildung 7. HindIII - Verdau der MCMV-BAC Mutanten im Vergleich zum MCMV-BAC Wildtyp

links: Die Insertion von HBs vergrößert das HindIII-L-Fragment von 7 kb auf 9 kb (Doppelband mit HindIII-I) rechts: Die Insertion von SEAP führt eine neue HindIII-Schnittstelle ein. Damit zerfällt das HindIII-L-Fragment in zwei neue, kleinere Fragmente (Pfeile!). wt: Wildtyp.

3.2 Charakterisierung der MCMV-Insertionsmutanten in vitro und in vivo

3.2.1 Markersekretion in vitro

Nach Infektion von NIH-3T3 Fibroblasten mit einer MOI von 1,0 stiegen mit zunehmender Zeit nach Infektion die Titer der sezernierten Proteinmarker wie erwartet gleichmäßig an. Abbildung 8.

Die Analyse der Marker-Sekretion in den drei einzelnen, kaskadenartig aufeinanderfolgenden Expressionsphasen "immediate early", "early" und "late" zeigte eine adäquate Sekretion in allen drei

Phasen (in Abbildung 9 dargestellt am Beispiel des MCMV-SEAP).

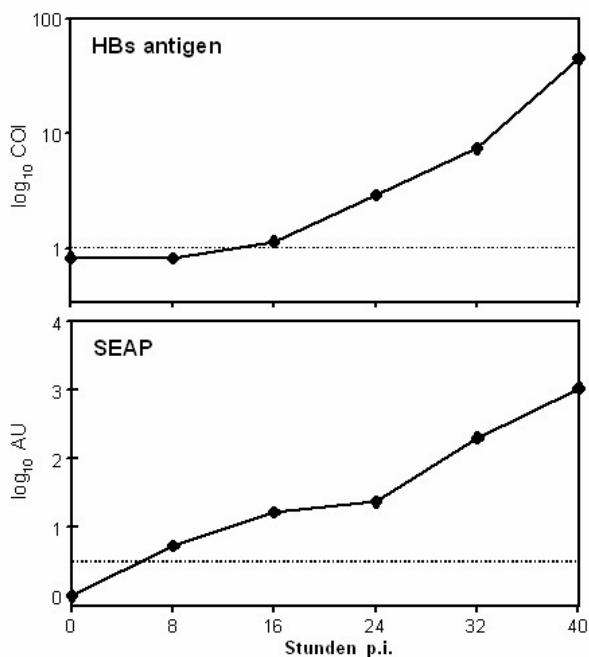
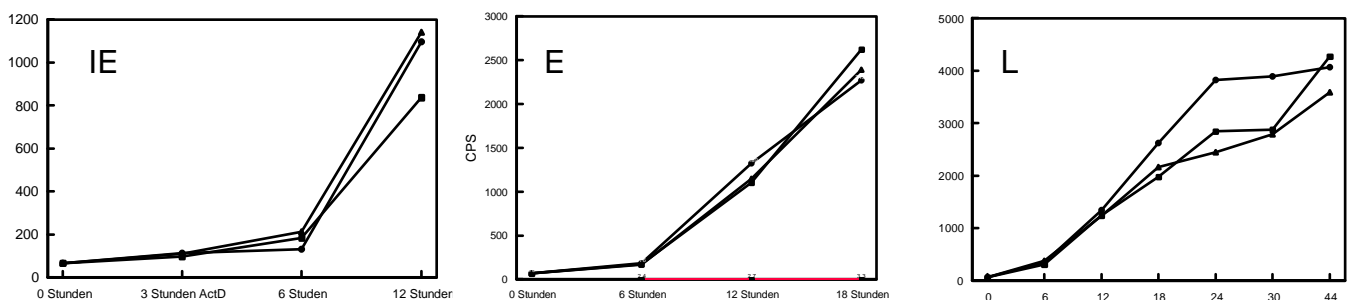


Abbildung 8. Sekretion von HBsAg bzw. SEAP in vitro nach Infektion von murinen Fibroblastenkulturen. COI: cut-of-index. AU: arbiträre Einheit.

Abbildung 9. Sekretion von SEAP in NIH3T3 Fibroblasten

in der immediate early Phase (links), der early Phase (Mitte) und der late Phase (rechts). Ansatz im

Triplikat. CPS: Counts per second (untere Abbildungen)



3.2.2 Freisetzung von Markern in vivo: Infektion von B-Zell-defizienten Mäusen

Um eine Aussage bezüglich der Kinetik der Proteinsekretion während der Primärinfektion zu erhalten, wurde zunächst die Replikation der Mutanten in vivo im Vergleich zum Wildtyp geprüft. Die Verwendung von Tieren mit B-Zell-Defizienz verhinderte die mögliche humorale Immunantwort gegen das Fremdprotein. Hierzu wurden neugeborene B-Zell-defiziente BALB/c - Mäuse mit der jeweiligen Virus-Mutante infiziert und eine Woche nach Infektion die Virustiter in Organen mittels Plaque-Assay bestimmt. Hierfür wurden die Tiere am Tag 7 bzw. 14 bzw. 21 getötet. Diesen Organitern wurden die Serumspiegel an sezerniertem HBsAg bzw. die Aktivitäten von sezernierter SEAP gegenübergestellt. Die Mutanten erreichten zum Wildtyp vergleichbare Virustiter in den verschiedenen Organen. Die Virusreplikation war also in vivo nicht eingeschränkt. Die Elimination von Virus erfolgte wie beim Wildtyp nach 14 Tagen. Die Konzentration bzw. Aktivität der Reporterproteine korrelierte gut mit der Virusaktivität in den Organen. Dabei war die Korrelation zwischen HBsAg und Leber (Korrelationskoeffizient 0,92) und HBsAg und Milz (0,92) sowie zwischen SEAP und Leber (0,98) und SEAP und Milz (0,91) am besten. Der Abfall der Virusreplikation in der Zeit von Tag 14 zu Tag 21 war auch anhand der Reporterproteine nachzuvollziehen. Abbildung 10.

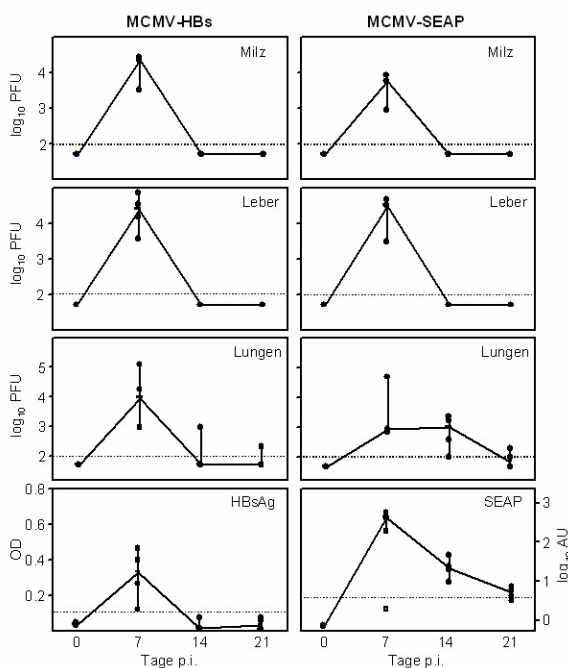


Abbildung 10. Detektion der Reporterproteine HBsAg und SEAP im Serum von B-Zell-defizienten BALB/c Mäusen.

Infektionsdosis 10^5 PFU. Im Vergleich dazu Organitern von Milz, Leber bzw. Lunge (je 3-4 Mäuse pro Virus und Zeitpunkt). Punkte: Werte für das einzelne Tier. Medianwerte sind mit einer Linie verbunden. Gestrichelte Linie: Detektionslimit bei der Organiternbestimmung bzw. Cut-Off für die Assays für HBsAg (links unten) bzw. SEAP (rechts unten). Offener Kreis: SEAP- Aktivität bei nicht – infizierten Mäusen (Negativkontrolle).

3.2.3 Charakterisierung der MCMV-Insertionsmutanten in vivo: Infektion von γ -bestrahlten Mäusen

Um die CMV Infektion in einem schwer immundefekten Organismus nachzuahmen, wurden Mäuse einer γ -Strahlung mit einer Einmaldosis von 6 Gy ausgesetzt, mit MCMV infiziert, und entsprechend den obigen Experiment nach 7, 14 und 21 Tagen getötet. Es erfolgte wiederum eine Gegenüberstellung von MCMV Titern in den einzelnen Organen mit der Konzentration bzw. Aktivität der sezernierten Reporterproteine. Zusätzlich wurde aus Mäuseblut DNA extrahiert und mit quantitativer PCR (TaqMan™) die Zahl der genomischen Kopien von MCMV bestimmt. Der deutliche Anstieg der Virusmenge nach 14 Tagen entsprach dem Anstieg der Reporterproteine. Nach 21 Tagen sanken die Titer der Markerproteine wiederum etwas ab, in etwa vergleichbar mit der Virus-Last in Lunge und Speicheldrüse. Am Tag 7 der Infektion – einem Zeitpunkt, an dem die Organtiter noch niedrig sind – konnten bereits hohe Titer der Markerproteine und eine hohe Zahl von Genomkopien im Blut identifiziert werden. Abbildung 11.

3.2.4 Kinetik der MCMV-Infektion : Infektion von BALB/c Mäusen, B-Zell-defizienten Mäusen und γ -bestrahlten Mäusen

Üblicher Weise erfolgt die Quantifizierung der Viruslast in vivo durch Opfern der Versuchstiere und Analyse der Virustiter in den verschiedenen Organen mittels Plaque-Assay. Solche Ansätze benötigen immer eine große Anzahl von Versuchstieren, weil zu jedem Zeitpunkt eine Gruppe von 3-6 Tieren geopfert werden muß, um die interindividuelle Varianz zu berücksichtigen. Eine longitudinale Untersuchung mit Beobachtung der Virusaktivität in ein und demselben Tier ist nicht möglich. Blut kann hingegen entnommen werden, ohne das Versuchstier zu töten. Daher sollte ein quantifizierbares Reporterprotein bzw. eine Quantifizierung der viralen Genome mittels PCR eine longitudinale Studie einer Infektion in ein-und-demselben Tier ermöglichen. Zur Prüfung dieser Hypothese wurden in einem weiteren Tierexperiment Mäuse (BALB/c; BALB/c

μ MT/ μ MT [B-Zell-defizient]; BALB/c γ -bestrahlt [schwer immundepletiert]) mit MCMV-SEAP infiziert und den Tieren wurde nach 7, 14, 21 bzw. 35 Tagen Blut entnommen. Im Blut wurde SEAP bzw. die Menge von MCMV- DNA quantifiziert bzw. die Menge an Virus mittels Plaque-Assay bestimmt.

Während normale und B-Zell-defiziente Mäuse die Infektion am Tag 21 p.i. überwinden, starben alle γ -bestrahlten Mäuse spätestens am Tag 14. B-Zell-defiziente Mäuse zeigten eine große Menge an MCMV-Genomen im Blut am Tag 14, normale BALB/c Mäuse nicht. Der Plaque-Assay erwies sich als ein wenig sensibler Parameter. Er war allenfalls bei γ -bestrahlten Mäusen sinnvoll einsetzbar. Bei immunkompetenten Mäusen zeigte der SEAP Assay die größte Sensitivität.

Abbildung 12.

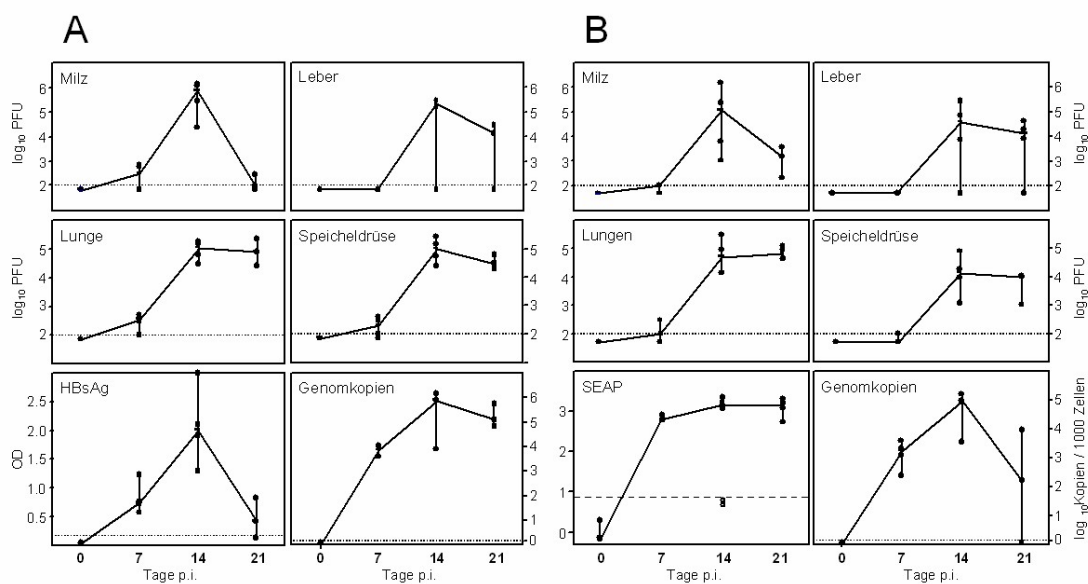


Abbildung 11. Detektion der Reporterproteine HBsAg und SEAP im Serum von γ -bestrahlten Mäusen.

Infektionsdosis 10^5 PFU. Im Vergleich dazu Organtiter von Milz, Leber, Lunge und Speicheldrüse (je 3-4 Mäuse pro Virus und Zeitpunkt; A für MCMV- HBsAg Infektion; B für MCMV-SEAP Infektion). Im Vergleich dazu Zahl der Genomkopien von MCMV pro 1000 Leukozyten bei MCMV- HBsAg (A, unten links) und bei MCMV-SEAP (B, unten rechts). Punkte: Werte für das einzelne Tier. Medianwerte sind mit einer Linie verbunden. Gestrichelte Linie: Detektionslimit bei der Organtiterbestimmung bzw. Cut-Off für die Assays für Reporterprotein bzw. MCMV-Genom. Offener Kreis: SEAP- Aktivität bei nicht –infizierten Mäusen (Negativkontrolle).

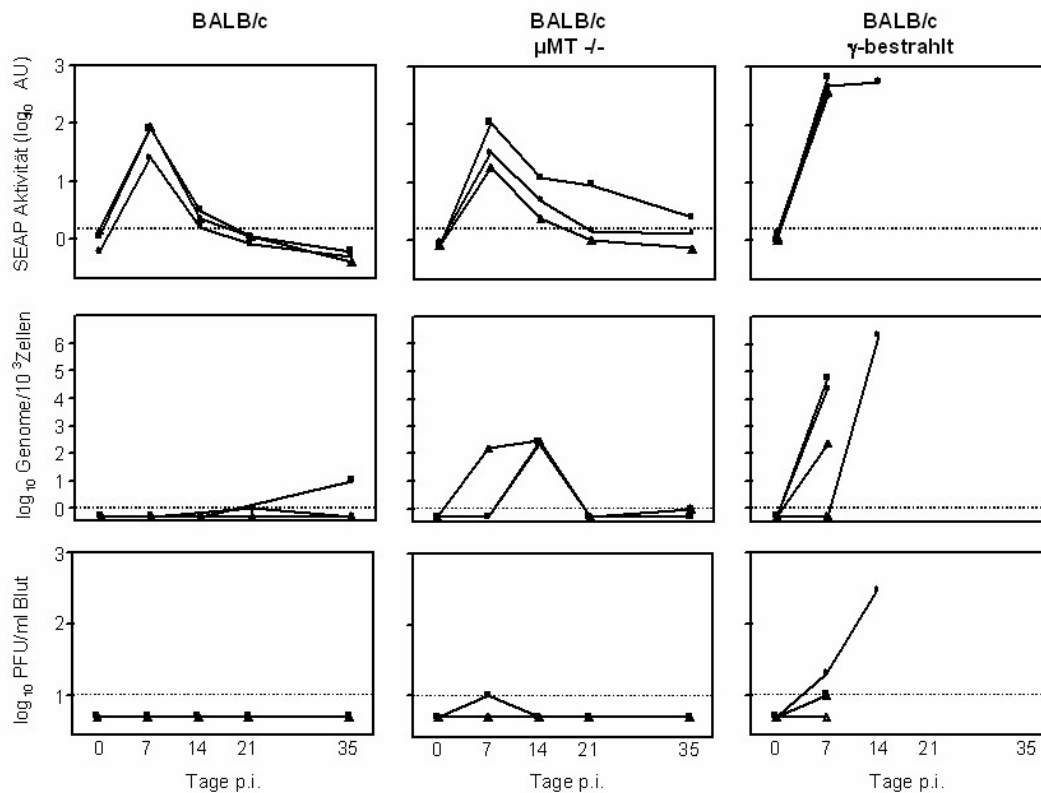


Abbildung 12. Infektionskinetik.

Infektionsdosis 10^5 PFU. Beobachtung der MCMV-SEAP Infektion in immunkompetenten BALB/c Mäusen (links), B-Zell-defizienten Mäusen (Mitte) und schwer immunkompromittierten Mäusen (rechts). Im Blut erfolgt die Bestimmung von SEAP (obere Zeile), die Quantifizierung der MCMV-Genomkopien (mittlere Zeile) und die Titration von Virus (untere Zeile). Jedes Symbol entspricht eine Gruppe von 3 Mäusen (gepooltes Blut). Die Line verbindet die Werte jeder Gruppe. Gestrichelte Linie: Detektionslimit bei der MCMV-Titerbestimmung bzw. Cut-Off für den SEAP- Assay bzw. die MCMV-PCR.

3.3 MCMV-Deletionsmutanten mit großen, mehrere Gene umspannenden Deletionen

Ca. 2/5 der 170 ORFs des MCMV sind essenziell. Für das Wachstum in vitro sind wahrscheinlich viele dieser Proteine entbehrlich und entfalten ihre Funktion erst bei der Infektion in vivo. Die Herstellung von Deletionsmutanten zur Charakterisierung der Genfunktion erlaubt Einsicht in die Pathogenese von CMV. Neben der gezielten Ausschaltung einzelner ORFs könnte es sinnvoll sein, ganze Fragmente des MCMV-Genoms zu deletieren. So wurde ursprünglich bei der Herstellung von MCMV-BAC ein Teil des nichtessenziellen HindIII-E- Fragmentes durch die BAC Kasette ersetzt (Nukleotide 209.756 to 217.934; ORF m152-159) (153) und erst im Nachhinein wieder re-inseriert. Es blieb jedoch unklar, wie weit man aus technischer Sicht das MCMV-Genom verkleinern kann. Ob die oben erwähnte Deletion in 5' Richtung bzw. in 3' Richtung erweitert werden kann, war Gegenstand der hier vorgestellten Untersuchung. Zur Prüfung der technischen Machbarkeit eines solchen Vorgehens und der Potenz des BAC-Rekombinationssystems wurde die Deletion daher erweitert. Hierzu galt es, geeignete Rekombinationsplasmide mit den entsprechenden Homologien zu konstruieren.

Für die Konstruktion einer Mutante upstream der BAC Kasette wurde das Plasmid pACYC177-HindIII-L (Abbildung 13A), in welches das HindIII-L Fragment kloniert worden war, mit BamHI und NdeI eröffnet und es wurde ein 4,2 kb Fragment isoliert. Es besteht aus 3,8 kb HindIII-L Fragment (Basenposition 180727 bis 184079; beabsichtige 5' Homologie) und einem 0,4 kb Restfragment von pACYC177. Dieses 4,2 kb Fragment wurde in das Plasmid pACYC99 integriert, welches mit BamHI und NdeI eröffnet wurde (Plasmid pACYC99-L, nicht abgebildet). Das Plasmid pComX, in welchem Elemente der BAC- Kasette enthalten sind, wurde mit NotI und HindIII eröffnet und es wurde ein 2,7 kb Fragment isoliert (beabsichtigte 3' Homologie, Abbildung 13B). pACYC99-L wurde sodann mittels eines partiellen Verdau mit HindIII und NotI eröffnet und mit dem 2,7 kb Fragment der BAC- Kasette ligiert (pACYC99-LX,

Abbildung 13C). Damit kamen die 5'-Homologie und die 3'- Homologie nebeneinander zu liegen. Dazwischen liegt ein Bereich von 100 bp als Rest von pACYC99. Im Anschluss an diesen Schritt der Klonierung erfolgte die Exzision der gesamten Homologiekassette mit HindIII und die Ligation dieser Kassette in pST76K_rspL, welches ebenso mit HindIII eröffnet wurde (Abbildung 13 D).

Der so entstandene Vektor pST76K-rpsL-LX diente als Shuttleplasmid für die homologe Rekombination in *E. coli*, Stamm CBTS. Im Vergleich zu pMBO bietet pST76K-rpsL und seine Abkömmlinge Vorteile, weil mit dem enthaltenen rpsL-Gen Sensitivität gegenüber Streptomycin besteht. Bei der Auflösung des Kointegrates konnte so durch Zugabe von Streptomycin in die LB- Agarplatten auf die Bakterien selektioniert werden, welche das Shuttleplasmid verloren hatten und nur noch das BAC (mutiert oder Wildtyp) enthielten. Nach Überprüfung der Orientierung mit Restriktionsfragmentanalyse erfolgte die homologe Rekombination wie zuvor beschrieben (unter Berücksichtigung folgender Adaptationen: Shuttleplasmid mit Resistenz gegen Kanamycin und nicht gegen Chloramphenicol; Zugabe von Streptomycin bei der Auflösung der Kointegrate). In Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden. A erkennt man die im HindIII Verdau die Herausbildung des Kointegrates mit den schon in Abb. 6F beschriebenen Banden bei 3,9 kb und bei 6,2 kb. Nach Auflösung des Kointegrates lässt sich MCMV-BAC DNA gewinnen, die entweder wieder Wildtyp entspricht oder die gewünschte Deletion (184079 – 217934) aufweist (Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden. B).

Für die Klonierung einer Mutante downstream von der BAC Kassette musste erst eine genügend lange Homologie im 3'- Bereich hergestellt werden. Hierfür erfolgte eine Fusion des HindIII-N Fragmentes, welches kloniert in pACYC177 vorlag, mit dem 3'- Ende des HindIII-E- Fragments, welches mittels PCR erzeugt wurde. Als geeignete Regionen für 19-mer Primer zeigten sich die MCMV-Bereiche 230021-230039 (forward) sowie 627-607 (reverse). Das amplifizierte Produkt wurde mit HpaI und HindIII verdaut (Abbau der Überhänge) und in das Plasmid pSL301 (Öffnung mit HindIII und PmlI) integriert (Plasmid pSL301E, ohne Abbildung).

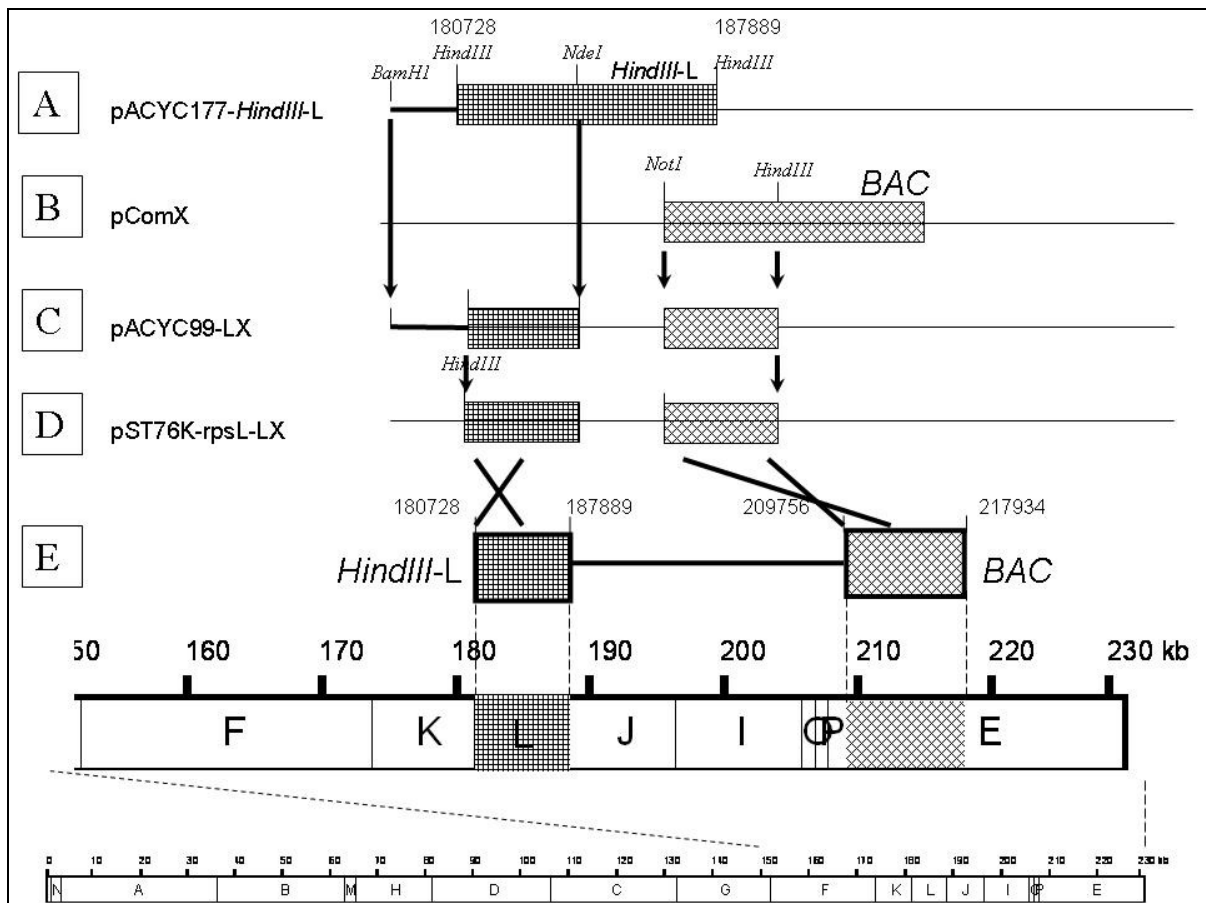


Abbildung 13. Klonierstrategie für das Shuttleplasmids pST76L-rspL-LX

oben: A – D: Schematische Darstellung der klonierten Plasmide zur Erlangung der zwei homologen Regionen zu einem Abschnitt aus HindL bzw. einem Abschnitt der BAC-Kassette. Einzelheiten siehe Text.
 E: unten: schematische Darstellung des gesamten MCMV-Genoms. Buchstaben bezeichnen die einzelnen HindIII-Fragmente. Mitte: Vergrößerung des 5' Abschnittes des MCMV-Genoms (150k-230k) mit Darstellung der Homologiebereiche. Nach homologer Rekombination resultiert die Deletion zwischen der Basenpositionen 187889 und 209756.

Nach Wiedereröffnung mit HindIII erfolgte die Integration des aus pACYC177 mit HindIII exzedierten Inserts (Plasmid pSL301-EN, Abbildung 15B). Die Gewinnung der 5' Homologie erfolgte durch partiellen Verdau des Plasmides pMM777 mit NotI und SpeI und Isolation einer 3,5 kb Bande, die homolog dem 3'

Ende der BAC – Kasette ist. Diese 3,5 kb Bande wurde in das Plasmid pBK-CMV inseriert (Öffnung mit NotI und XbaI) (Plasmid pBK-CMV-MM Abbildung 15A).

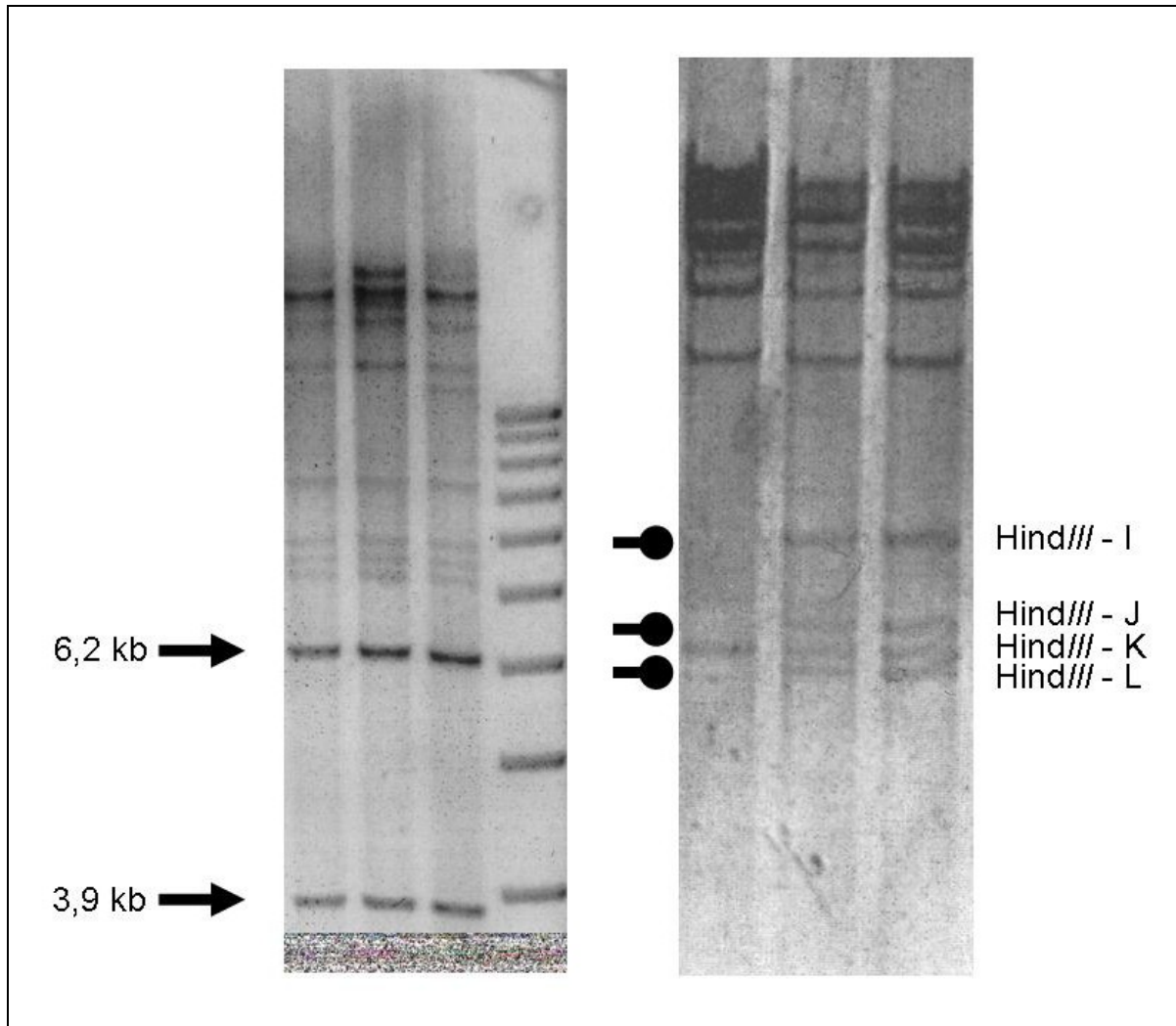


Abbildung 14. Kointegrat (links) und Deletionsmutante (rechts)

A (linkes Gel): Neben den MCMV-HindIII-Bandenummuster erkennt man die Banden bei 3,9 und 6,2 kb für das integrierte Shuttleplasmid. B (rechtes Gel): linke Bande: MCMV-Deletionsmutante. Mitte / rechts: MCMV – Wildtyp. Es verschwinden die Banden der HindIII – Fragmente L, J und I (runde Pfeile). Das Hind E Fragment ist um 20 kb kürzer. Hind O und Hind P, welche ebenfalls verschwunden sind, kommen nicht zur Darstellung (jeweils 1,1 bzw. 1,0 kb)

Nach Präparation dieses Plasmids erfolgte die erneute Exzision des BAC-Inserts mit NheI und NotI und die Integration in pSL301-EN (Öffnung mit NheI und NotI) (Plasmid pSL301-MMEN,

Abbildung 15C). Die Klonierung der Homologiekassette in pST76K-rspL erfolgte schließlich durch partiellen Verdau von pSL301-MMEN mit HindIII. Der so entstandene Vektor pST76K-rpsL-MMEN (

Abbildung 15D) diene als Shuttleplasmid für die homologe Rekombination in E. coli, Stamm CBTS. Der Rekombinationsprozess erfolgte wie oben beschrieben (ohne Abbildung).

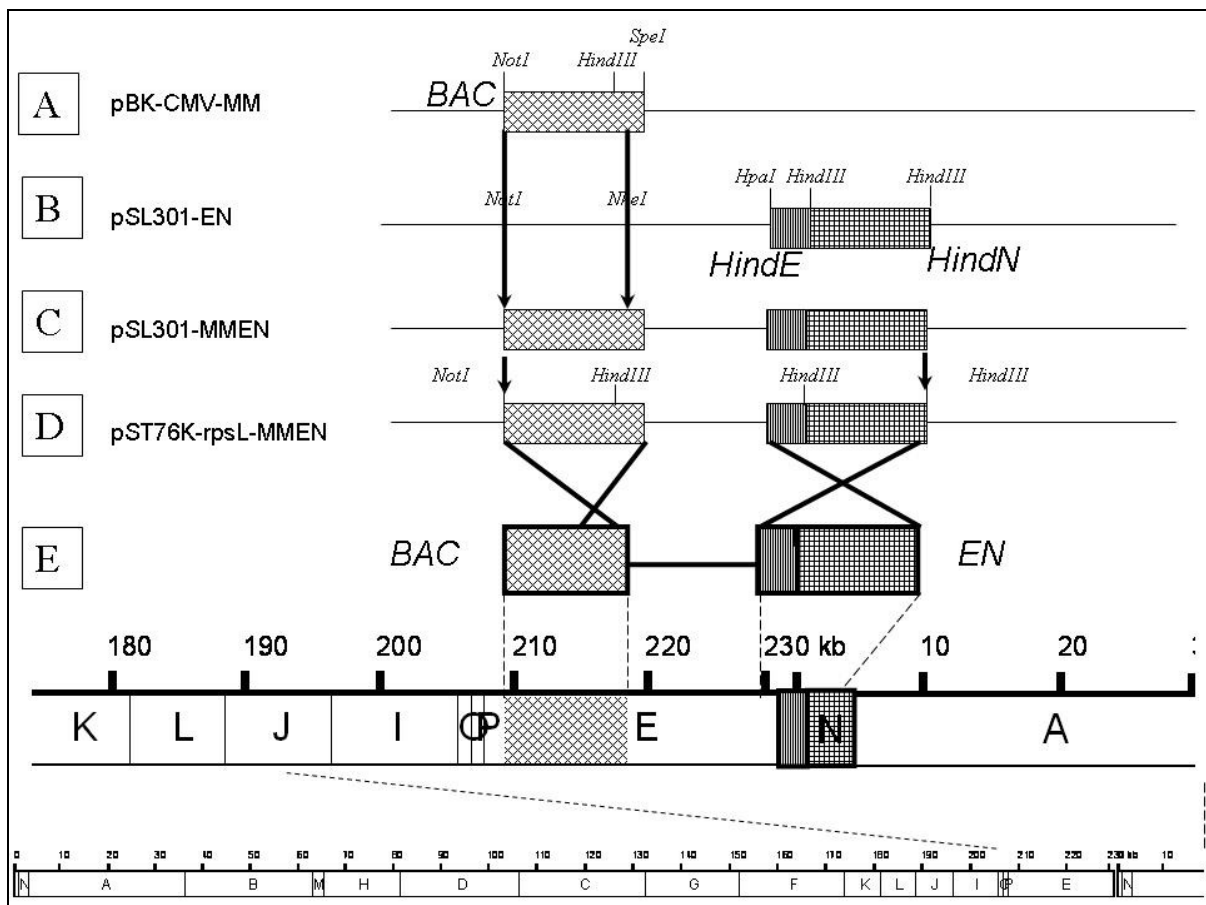


Abbildung 15. Klonierstrategie für das Shuttleplasmids pST76L-rspL-MM

oben: A – D: Schematische Darstellung der klonierten Plasmide zur Erlangung der zwei homologen Regionen zu einem Abschnitt aus der BAC Kasette bzw. einem fusionierten Abschnitt aus HindE und Hind N. Einzelheiten siehe Text. E: unten: schematische Darstellung des gesamten MCMV-Genoms. Buchstaben bezeichnen die einzelnen HindIII-Fragmente. In linearisierter Form folgt dem Hind E Abschnitt wieder Hind N. Mitte: Vergrößerung des 5' Abschnittes des MCMV-Genoms bzw. der Junctionsstelle (150k-230k-30k) mit Darstellung der Homologiebereiche.

Nach homologer Rekombination und Auflösung des Kointegrats mit entsprechender Selektion auf einem Steptomycin- haltigen Nährmedium wurde die DNA gereinigt und der Versuch unternommen, mutiertes Virus nach Transfektion in Fibroblasten zu generieren. Aus beiden Deletionsmutanten konnten keine replikationsfähigen MCMV Mutanten *in vitro* rekonstituiert werden. Man kann daraus schließen, dass durch die Deletion essentielle Bestandteile für eine Replikation *in vitro* betroffen worden sind. Trotz dieser *cul-de-sac* Situation erlaubten die durchgeführten Experimente Einblicke in die Potenz des *E.coli* Kloniersystems. Es war davor keineswegs trivial und erwiesen, ob es zwischen zwei so unterschiedlichen Homologiepaaren (reine Homologiesequenz ohne Insert versus Homologie mit 21,9 kb bzw. 12,1 kb MCMV-Sequenz dazwischen) überhaupt zu einer Kointegration kommen kann. Die technische Machbarkeit von dermaßen großen Deletionen in *E. coli* konnte mit den Ergebnissen aufgezeigt werden.

3.4 MCMV- Deletionsmutanten mittels Transposonmutagenese sowie Herstellung von Revertanten dieser Deletionsmutanten

3.4.1 Konzept und Strategie

Man geht davon aus, dass etwa 50 Genprodukte der 170 ORFs des MCMV für die Replikation in vitro essenziell und die übrigen ca. 120 Gene für die Vermehrung in vitro unbedeutend sind, bzw. eine Attenuierung des Wachstums verursachen, ohne die Replikation des MCMV und die Produktion von neuem, infektiösem Virus zu unterbinden. Man kann postulieren, dass in Bezug auf Funktion in vitro ein fehlendes Genprodukt entweder zu einem normalen Phänotyp („nicht essenziell“, siehe 3.1), zu einer funktionellen Einschränkung („attenuiert“), oder zu einem kompletten Replikationsdefizit („essenziell“, siehe 3.3) führt. Während essenzielle Gene rasch erkannt werden, weil die resultierende MCMV Mutante sich in Zellkultur nicht vermehrt, ist die Herstellung und Analyse von Mutanten, die zu einer Attenuierung führen, bisher nur bedingt möglich gewesen. Mit der Transposonmutagenese ergeben sich neue Möglichkeiten. In dieser Arbeit wurde versucht, attenuierte MCMV-Mutanten einer ersten Beobachtung zu unterziehen. Hierzu wurde eine Reihe von Mutanten aus einer Deletionsmutanten- Bibliothek während ihres Wachstums in NIH3T3 Fibroblasten beobachtet um Viren zu identifizieren, welche ein verlangsamtes Wachstum in Fibroblasten aufweisen. Für diese Mutanten konnte dann geprüft werden, welches Gen das Wachstumsdefizit verursacht hatte. Nach den Grundsätzen der klassischen Genetik wurde vom Phänotyp auf den Genotyp geschlossen und der Beitrag des fehlenden Gens zum Wachstumsdefizit wurde quantifiziert.

3.4.2 Herstellung und Screening einer MCMV- Deletionsmutanten- Bibliothek

Identifikation von attenuierten Virusmutanten. Das Plasmid pTsTM16 wurde in *E. coli* (DH10B) mittels Elektroporation transformiert und die Transposon-Mutagenese durchgeführt.

Von den so hergestellten Kolonien wurden 576 zufällig ausgewählt. Von jeder Bakterienkolonie wurde eine Glycerolkultur bei -70°C tiefgefroren. Mit den E.coli, welche das virale Genom enthielten, wurden NIH3T3 Fibroblasten in Zellkultur (24-well-Schalen) infiziert. Neben MCMV-BAC pSM3fr enthalten die verwendeten Bakterien das Plasmid pGB2-inv-hly. Das Plasmid kodiert für das Invasin und das Hämolyysin aus *Yersinia pseudotuberculosis*. Dadurch kann E. coli in die Zelle eindringen und die DNA direkt in eukaryontische Zellen transferiert werden (58). Die murinen Zellen wurden anschließend weiter expandiert und es wurde regelmäßig alle 3 Tage unter dem Fluoreszenzmikroskop die Bildung und die Ausbreitung von Virusplaques in den infizierten Zellen qualitativ beurteilt. Es konnten 19 Mutanten mit offensichtlichen Wachstumsdefizit identifiziert werden. Der jeweilige zu diesen Virusmutanten zugehörige Bakterienklon wurde in der Bibliothek wieder aufgesucht und die darin enthaltene DNA wurde näher untersucht.

Bestimmung der Insertionsstelle. Aus Übernacht-Kulturen derjenigen 19 Bakterienklone, welche ein MCMV-BAC mit offensichtlicher Retardierung des Wachstums *in vitro* aufwiesen, wurde DNA mittels alkalischer Lyse extrahiert. Eine nähere Einschätzung der Insertionsstelle erfolgte durch Restriktionsenzymverdau der MCMV-BAC DNA und Untersuchung der einzelnen Restriktionsfragmente. Weil pTsTM16 Restriktionsstellen für EcoRI, NotI und HindIII besitzt, kann die die Insertionsstelle bis auf $\sim 100\text{-}200$ bp genau abgeschätzt werden. Das Transposon stellte sich auf dem Gel als zusätzliche Bande bei 1,9 kb (HindIII) bzw. bei 1,4 kb (EcoRI) dar. Abbildung 16. Abbildung 17.

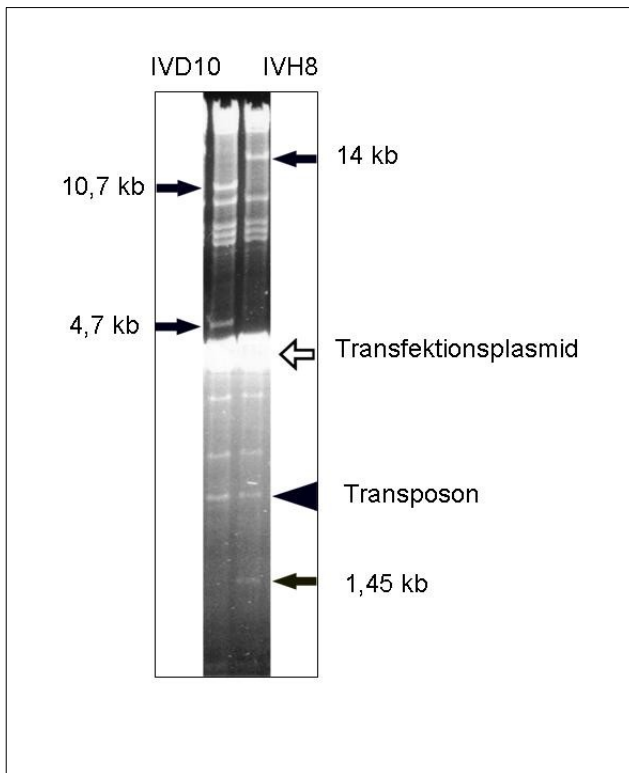


Abbildung 16. Beispiele einer Festlegung
 Lokalisation der Transposon – Insertion mittels
 Restriktionsenzymverdauer.
 Oben links, Agarosegel. HindIII Verdau der
 MCMV-BAC DNA der Transposonmutanten
 IVD10 (links) und IVH8 (rechts). Links: Das 15,5
 kb große HindIII-H Fragment zerfällt in eine 10,7
 kb und eine 4,7 kb Bande (Pfeile); erwartete
 Position: 75557. Rechts: Das 15,5 kb große HindIII-
 H Fragment zerfällt in eine 14 kb und eine 1,45 kb
 Bande (schwarze Pfeile). Erwartete Position: 66248.
 Dicker schwarzer Pfeil: Transposon-
 Bande. Offener Pfeil: Transfektionsplasmid pGB2-inv-hly

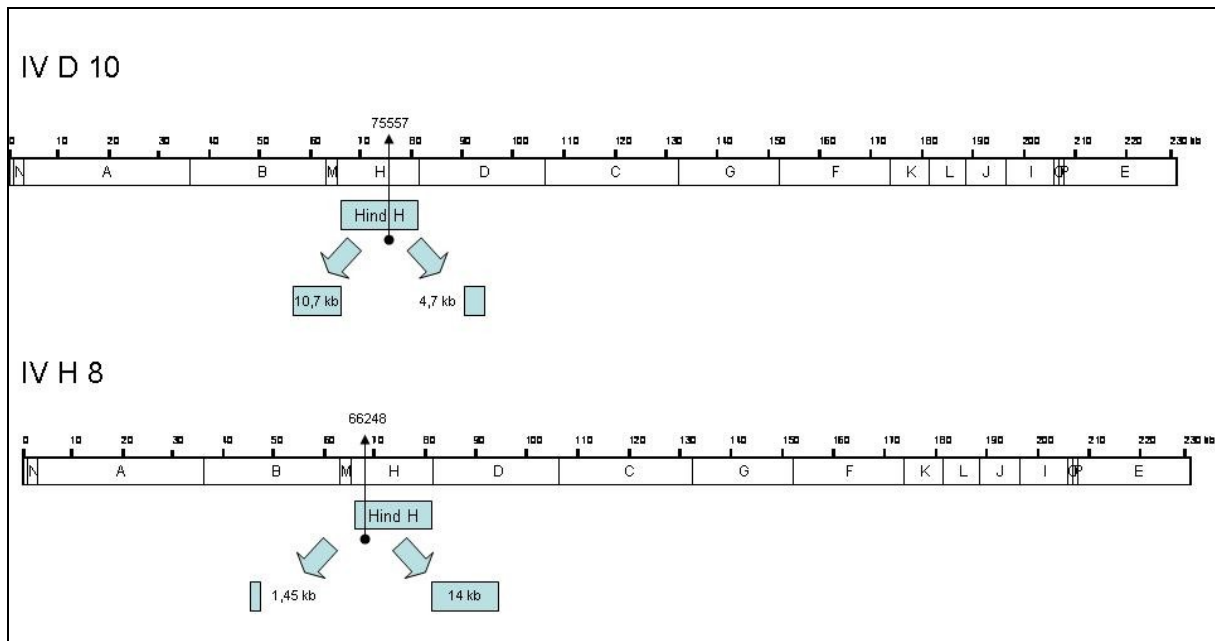


Abbildung 17. Schematische Darstellung der Transposoninsertion in das MCMV Genom
 am Beispiel von IVD90 und IVH8. runder Pfeil: Insertionsstelle. Durch den Einbau in das HindH
 Fragment kommt es zu einer Teilung des ursprünglich 15,4 kb großen Fragmentes in zwei kleinere, welche
 die genauere Einordnung der Insertionsstelle erlauben

Sequenzierung. Zur exakten Bestimmung der Insertionsstelle wurde eine Sequenzierung durchgeführt. Der Sequenzierungsprozess erfolgte durch einen kommerziellen Dienstleister (Fa. Medigenomix, Martinsried). Die Sequenzen wurden mit der Sequenz für MCMV abgeglichen und die exakte Position der Insertion wurde ermittelt. Die Ergebnisse aus der Restriktionsfragmentanalyse und aus der direkten Sequenzierung waren für alle analysierten Mutanten deckungsgleich und sind in der Tabelle 1 zusammengefasst.

| Betroffener ORF | Mutante Nr. | Position |
|---------------------------|-------------|----------|
| M27 | | |
| | I F4 | 32.408 |
| | II B12 | 32.752 |
| | II C7 | 33.241 |
| M32 | | |
| | IV D9 | 40.346 |
| M34 | | |
| | I G11 | 42.991 |
| M45 | | |
| | VI E6 | 60.488 |
| M47 | | |
| | VI A1 | 64.413 |
| | III H8 | 65.437 |
| | IV H8 | 66.299 |
| | III D11 | 65.753 |
| | II G4 | 66.014 |
| M50 | | |
| | IV D10 | 75.535 |
| M76 | | |
| | II F4 | 108.411 |
| | III B1 | 108.724 |
| m165 | | |
| | IV D5 | 223.912 |
| M43 Promoterregion | | |
| | II G6 | 57.176 |
| Doppelinsertion | | |
| | III B2 | Entfällt |
| | III F10 | Entfällt |
| | VI E7 | Entfällt |

Tabelle 1. Dargestellung der durch Sequenzierung identifizierten Insertionsstelle bei den langsam wachsenden MCMV- Transposonmutanten.

Der vermutete betroffene ORF wurde durch Sequenzvergleich mit der MCMV-Sequenz ermittelt.

Es konnten 7 ORFs ermittelt werden, deren Deletion ein verlangsamtes Wachstum in vitro in NIH3T3 Fibroblasten zeigt: M32, M34, M45, M47, M50, M76, m165. Bei einer Mutante erfolgte

die Insertion des Transposons nicht in den ORF selbst, sondern in die 5'- gelegene Promoterregion und führte ebenso zu verlangsamtetem Wachstum. Bei drei phänotypisch auffälligen Mutanten konnten Doppelinsertionen des Transposons nachgewiesen werden, so dass eine weitere Sequenzierung nicht möglich war und eine weitere Charakterisierung nicht sinnvoll erschien. Bei drei Mutanten erfolgte die Insertion des Transposons in den ORF M27, von dem bekannt ist, dass die Deletion das Wachstumsverhalten der Mutante *in vivo*, aber nicht *in vitro* beeinflusst (1). Diese Mutante wurde für weitere Versuche neben dem Wildtyp MCMV-BAC als Kontrolle verwendet, um Effekte zu erfassen, welche allgemein durch Insertion des Transposons TnMax16 und dem dabei exprimierten green fluorescence protein (GFP) ausgelöst werden.

3.4.3 Semiquantitative und quantitative Untersuchungen zum Wachstumsverhalten von MCMV-Mutanten

Semiquantitative Untersuchung. Die Produktion von green fluorescence protein (GFP) in den mit Transposon-Mutanten infizierten Zellen erlaubt die schnelle Beurteilung der Anzahl von infizierten Zellen semiquantitativ Aussagen zur Geschwindigkeit der viralen Dissemination. Die Infektion erfolgte durch eine vordefinierten Menge invasiver Bakterien. Nach 96, 144 bzw. 216 Stunden wurde die Beurteilung des zytopathologischen Effektes vorgenommen. Unter diesen Bedingungen konnte man für M27 Mutanten und für Wildtyp einen ausgeprägten zytopathologischen Effekt *in vitro* beobachten; die M32, M34 und M47 Mutanten wie auch die Mutante in der M43 Promoterregion erreichten erst nach mehreren Passagierungen diesen vollständigen zytopathologischen Effekt. Die Mutanten von M50, M76 und M165 hatten auch nach mehreren Passagierungen ein ausgeprägtes Wachstumsdefizit und die Mutante von M45 war *de facto* nicht expandierbar. Die Ergebnisse der semiquantitativen licht- und fluoreszenzmikroskopischen Analyse sind in Tabelle 2 Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden. zusammengefasst.

| Betroffener ORF | Mutante Nr. | 96 Stunden | | 144 Stunden | | 216 Stunden | |
|--------------------|-------------|------------|--------|-------------|--------|-------------|--------|
| | | Plaque | Zellen | Plaque | Zellen | Plaque | Zellen |
| Wildtyp | | | | | | | |
| | WT | ¥¥¥ | ααα | ¥¥¥ | ααα | ¥¥¥ | ααα |
| M27 | | | | | | | |
| | I F4 | ¥¥¥ | ααα | ¥¥¥ | ααα | ¥¥¥ | ααα |
| | II B12 | ¥¥¥ | ααα | ¥¥¥ | ααα | ¥¥¥ | ααα |
| | II C7 | ¥¥¥ | ααα | ¥¥¥ | ααα | ¥¥¥ | ααα |
| M32 | | | | | | | |
| | IV D9 | ¥ | j | ¥ | j | ¥¥¥ | ααα |
| M34 | | | | | | | |
| | I G11 | ¥¥ | j | ¥¥ | j j | ¥¥¥ | ααα |
| M45 | | | | | | | |
| | VI E6 | --- | j | --- | j | --- | j |
| M47 | | | | | | | |
| | VI A1 | --- | j | ¥ | j | ¥¥ | αα |
| | III H8 | --- | j | ¥ | j | ¥¥ | αα |
| | IV H8 | ¥ | j | ¥ | α | ¥¥¥ | ααα |
| | III D11 | ¥ | j | ¥ | α | ¥¥¥ | ααα |
| | II G4 | ¥ | α | ¥¥ | αα | ¥¥¥ | ααα |
| M50 | | | | | | | |
| | IV D10 | I | I | --- | j | ¥ | j |
| M76 | | | | | | | |
| | II F4 | ¥ | j j j | ¥ | j | ¥ | j |
| | III B1 | ¥ | j j j | ¥ | j | ¥ | j |
| m165 | | | | | | | |
| | IV D5 | --- | j | ¥ | j | ¥ | j |
| M43 Promoterregion | | | | | | | |
| | II G6 | --- | ααα | ¥ | α | ¥¥¥ | ααα |
| Doppelinsertion | | | | | | | |
| | III B2 | --- | j | ¥ | j | ¥¥ | αα |
| | III F10 | I | I | I | I | I | I |
| | VI E7 | I | I | I | I | I | I |

Tabelle 2. Semiquantitative mikroskopische Analyse des Wachstumsverhaltens von MCMV-Transposonmutanten.

Der zytopathologische Effekt wurde nach 96, 144 sowie 216 Stunden beurteilt, die Zellen nach 97 und 141 Stunden passagiert. Zeichenerklärung: ¥ Plaque; α infizierte Zellcluster, j isolierte infizierte Zellen; I keine erkennbare Infektion; 1 Zeichen: vereinzelt Vorkommen (1/10 bis 3/10); 2 Zeichen: mäßig häufig (4/10 – 6/10); 3 Zeichen : häufig (7/10-10/10)

Quantitative Untersuchung. Für die weitere quantitative Analyse wurden die Mutanten IF4 (M27), IG11 (M34), VI A1 (M47), III H8 (M47), II F4 (M76) sowie IV D5 (m165) ausgewählt und jeweils bezüglich der Zahl der PFU mit Wildtyp-MCMV verglichen. Unter den mehreren

MCMV-Mutanten, welche den ORF M27, M47, M76 sowie m165 betreffen, wurde jeweils die Mutante gewählt, welche möglichst proximal des Initiierungskodons liegt.

Von den M32-, M45- und M50-Mutanten konnten keine ausreichenden Virustiter gewonnen werden, sodass sie sich einer quantitativen Betrachtung entzogen. Die Mutante in der Promoterregion wurde nicht weiter untersucht. Für M27, M34 sowie m165 konnte die Infektion mit einer MOI von 0,1 durchgeführt werden. Für die übrigen Virusmutanten musste eine MOI von 0,05 gewählt werden, weil trotz mehrfacher Passagierung das Erreichen einer Viruskonzentration für eine Infektion mit MOI von 0,1 nicht möglich war.

Für die M27-Mutante zeigte sich – konsistent zu den Beobachtungen aus der semiquantitativen Versuchsreihe – eine nur geringfügig verminderte Produktivität von infektiösem Virus nach 4 bzw. 8 Tagen p.i. im Vergleich zum Wildtyp (Mittelwerte nach 8 Tagen: 9×10^6 vs. 2×10^7 PFU/ml [$p=0,25$]). Für die Mutanten des ORF M34, des ORF M76 und des ORF m165 war die Menge an infektiösen Virus nach 4 bzw. 8 Tagen signifikant niedriger als bei Wildtyp oder bei M27 (Mittelwerte nach 8 Tagen: 3×10^5 PFU /ml für M34 [$p=0,03$]; 7×10^4 PFU/ml für M76 [$p<0,01$]; 2×10^5 PFU / ml für m165 [$p=0,03$]). Das stärkste Defizit bei der Produktivität von infektiösen Viruspartikeln hatten die Mutanten, bei denen ORF M47 betroffen war. Hier wurde ein Plateau bereits nach 4 Tagen erreicht und nach 8 Tagen waren keine höheren PFU Titer nachweisbar (Mittelwerte am Tag 8: $1,2 \times 10^4$ PFU/ml für IIIH8 [$p<0,01$]; $1,6 \times 10^3$ PFU/ml für VIA1 [$p<0,01$]). Auffällig dabei ist, dass im semiquantitativen Test die Fähigkeit zur Plaquebildung für M47 Mutanten nicht besonders eingeschränkt war (allerdings war die Größe der Plaques deutlich kleiner als bei Wildtyp) und dass die beiden M47 Mutanten sich in ihrem Wachstumsverhalten um fast eine log-Stufe unterschieden ($p=0,008$). Dabei wies die Mutante, bei der die Insertion näher am Startkodon lag, das stärkere Defizit bei der Produktion von infektiösen Partikeln auf. Die Wachstumskurven jeweils im Vergleich zum Wildtyp sind in Abbildung 18 graphisch dargestellt.

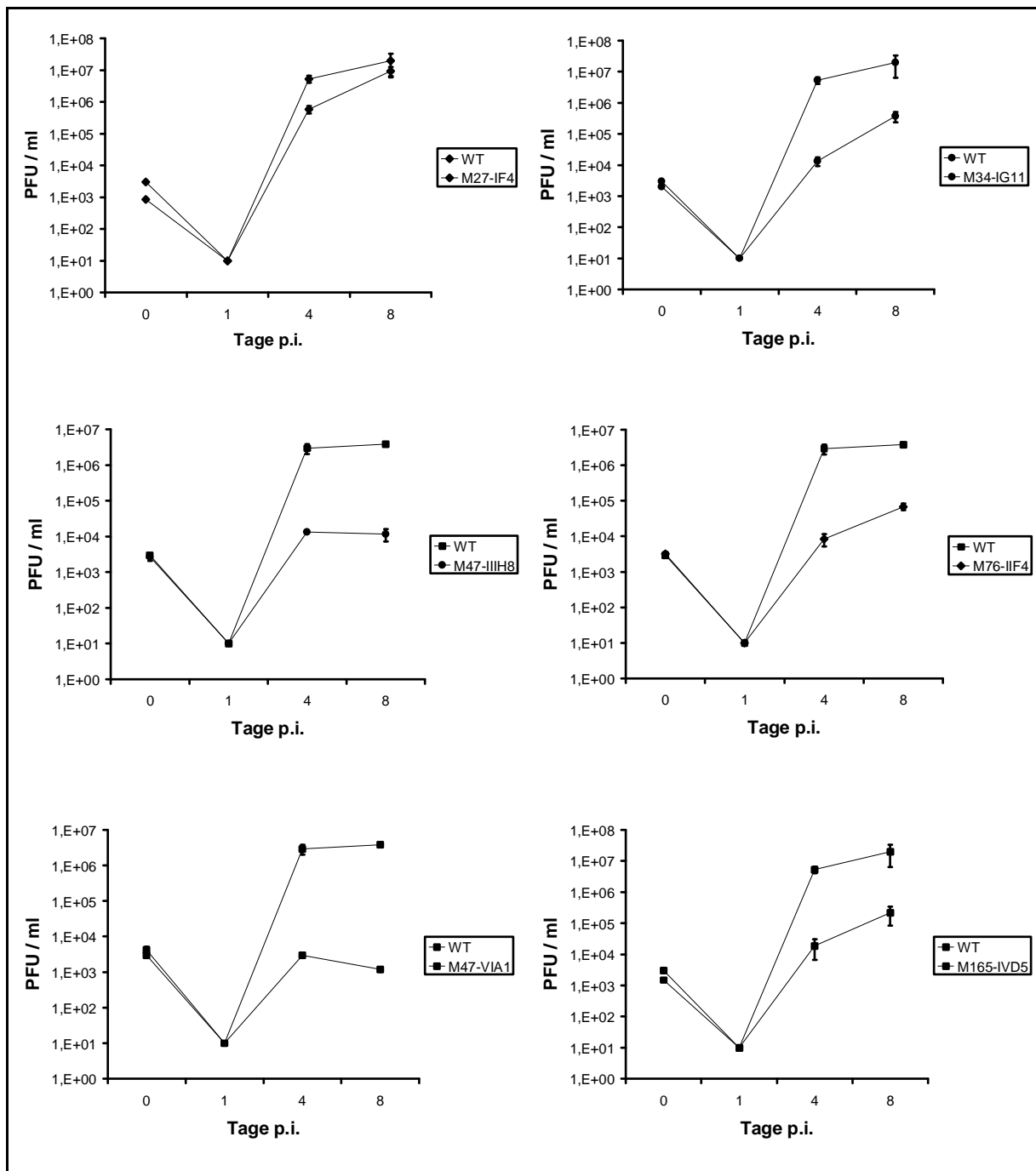


Abbildung 18. Produktivität von infektiösem Virus in NIH 3T3 Fibroblasten

bei den MCMV- Transposonmutanten des ORF M27, M34, M47, M76 und m165 jeweils im Vergleich zu Wildtyp.

Messungen jeweils im Triplikat; Balken: Standardabweichung. Infektion von Zellen mit einer MOI von 0,1 (M27, M34, M165) bzw. 0,05 (M76, M47). Die Titer wurden mit einem Plaque-Assay jeweils am Tag 0, (1), 4 und 8 bestimmt.

3.4.4 Herstellung von Revertanten zu den MCMV- Transposonmutanten mit homologer Rekombination in E.coli

Durch die Transposonmutagenese und die damit verbundene Schädigung des entsprechenden ORF konnten MCMV-Mutanten identifiziert werden, deren Vermehrung in NIH 3T3 Fibroblasten attenuiert ist. Zur Verifizierung des unmittelbaren kausalen Zusammenhanges zwischen der Zerstörung des offenen Leserahmens und der Beobachtung eines attenuierterer Phänotyps war beabsichtigt, Revertanten mittels homologer Rekombination in E. coli herzustellen. Exemplarisch hierfür wurden die Mutanten der ORF M32 (IVD9) und M76(IIF4) ausgewählt. Aus dem HindIII- B Fragment, welches in pACYC177 kloniert vorgelegen war, wurde mit SphI ein 4356 bp Fragment isoliert (Abbildung 19A) und in das Plasmid pST76K_rpsL kloniert, welches ebenfalls mit SphI eröffnet wurde (Bereich der Homologie für Rekombination: MCMV Basenpaarposition [38.193;42.549]; Insertion in IVD9 bei MCMV Basenpaar 40.346; neues Plasmid pST-BSphI, Abbildung 19B).

Aus dem HindIII- C Fragment, welches auch in pACYC177 vorgelegen war, wurde mit BamHI ein 6564 bp Fragment isoliert und in pST76K_rpsL kloniert, welches entsprechend mit BamHI eröffnet wurde (Bereich der Homologie für Rekombination: [105.497;112.061]; Insertion in IIF4 bei MCMV Basenpaar 108411; neues Plasmid pST-CBamHI). Abbildung 20.

Anschließend wurden die Homologieplasmide pST-BsphI und pST-CBamHI mit den MCMV-Mutanten IIF4 und IVD9 in E. coli co-transformiert und durch homologe Rekombination Revertanten generiert. Für das Kointegrat (Abbildung 21A) bzw. für die Revertante (Abbildung 21B) wurde DNA isoliert und auf einem Agarosegel analysiert. Anschließend erfolgte die Transfektion der Revertanten-DNA in NIH3T3 Fibroblasten, die Herstellung von Virustitern und die quantitative Einordnung der Wachstumsverhaltens wie oben beschrieben. In NIH3T3 Fibroblasten war die Virusvermehrung der Revertanten dem MCMV-BAC Virus gleich und entsprach somit den Wildtypeigenschaften. Damit wurde die kausale Genotyp-Phänotyp-Verbindung gesichert.

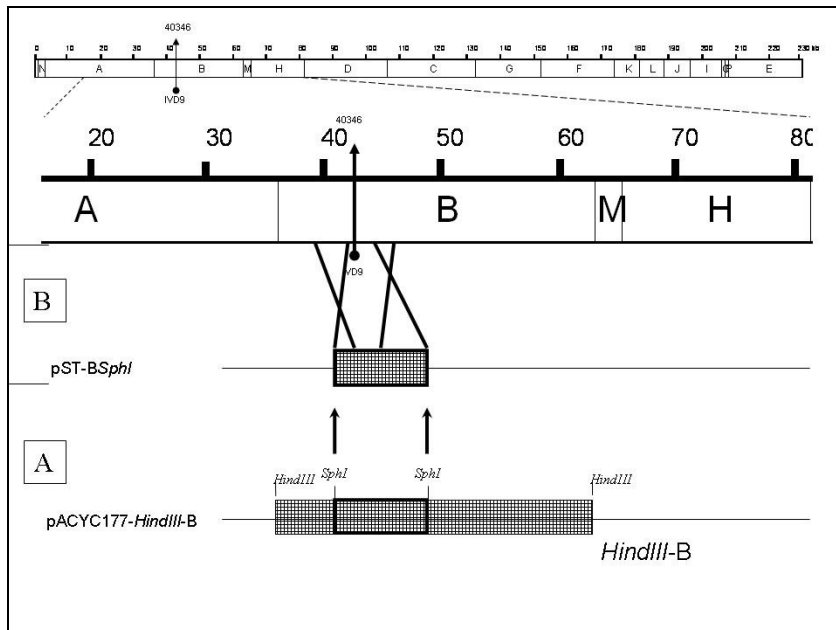


Abbildung 19. Klonierstrategie für die Revertante zur Transposonmutante IVD9.

Oben: Darstellung des MCMV Genoms in linearisierter Form. Buchstaben bezeichnen die einzelnen HindIII- Fragmente. Runder Pfeil: Transposon- Insertionsstelle.

A und B: Aus dem HindIII-B Fragment wird ein Homologiebereich ausgesucht, welche die Insertionsstelle (Pos. 40.346) nach der 3' und der 5' Seite passend flankiert (SphI-Restriktionsschnittstelle; Flankierung [38.193; 42.549].

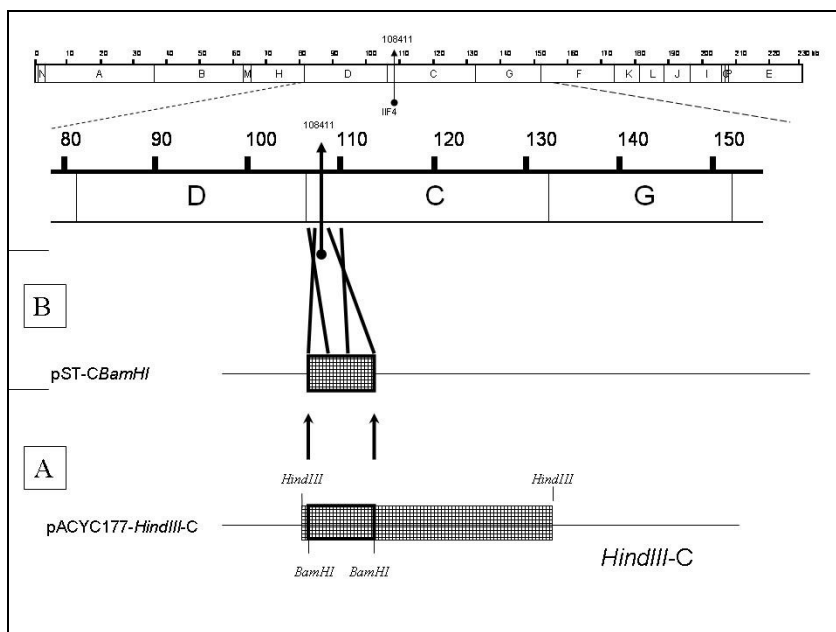


Abbildung 20. Klonierstrategie für die Revertante zur Transposonmutante IIF4

Analog zu Abbildung 19. (Insertionsstelle 108.411; Flankierung [105.497; 112.061].

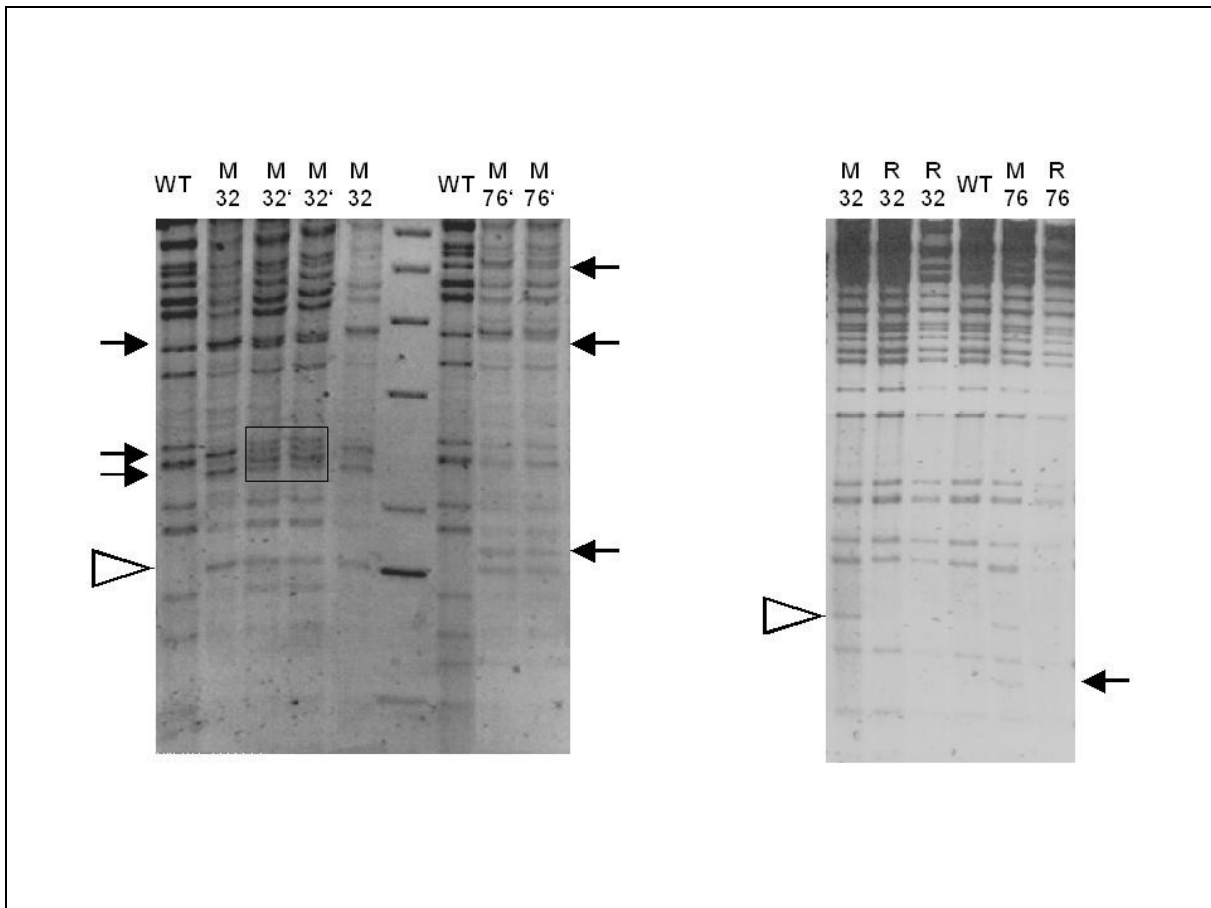


Abbildung 21. EcoRI Verdau zur Überprüfung der Kointegration.

(A. linkes Gel) Durch die Insertion des Transposons kommt es im Vergleich zu Wildtyp zu einer neuen Bande bei 1,4 kb (weißer Pfeil). Mit der Insertion des Transposons im ORF M32 (Pos. 40346) erfolgt unmittelbar neben der EcoRI Schnittstelle 40291, so dass es zu keiner Ausbildung von neuen sichtbaren Banden im Vergleich zu Wildtyp kommt. Die Kointegration von pST-B führt zu 2 neuen Banden bei 2,4 kb und somit zur Ausbildung einer 4-fach-Bande (Kasten) und zu einer neuen Bande bei 3,8 kb (jeweils schwarze Pfeile). Mit der Insertion des Transposons im ORF M76 (Pos. 108411) erfolgt innerhalb eines 36,5 kb großes EcoRI- Fragmentes und führt im Vergleich zu einer neuen Bande bei 1,18 kb. Die Kointegration von pST-C führt zu einer neuen Bande von 1,75 kb, 3,8 kb und 4,8 kb (jeweils schwarze Pfeile). WT: Wildtyp. M32: Mutante IVD9. M32': Kointegrat aus IVD9 und pST-B. M76': Kointegrat aus IIF4 und pST-C.

B (rechtes Gel). EcoRI Verdau zur Darstellung der Revertante. Bei der Revertante zu der M32-Mutante verschwindet die Transposon- Bande bei 1,4 kb (weißer Pfeil); bei der Revertante zu der M76-Mutante verschwindet die Transposon- Bande bei 1,4 kb (weißer Pfeil) und die Bande bei 1,18 kb. R32: Revertante von IVD9. R76: Revertante von IIF4.

3.4.5 Elektronenmikroskopische Darstellung von MCMV-Mutanten in Fibroblastenkulturen

Mit der klassisch genetischen Methode der Beobachtung eines veränderten Phänotyps (langsame Virusvermehrung) konnten aus einer Mutantenbibliothek MCMV- Transposonmutanten isoliert werden und die zugrundeliegende genetische Veränderung charakterisiert werden. In einem weiteren Schritt war sodann beabsichtigt, komplementär dazu mit einem Ansatz im Sinne der inversen Genetik vom bekannten Genotyp auszugehen und nach eventuellen ultrastrukturellen morphologischen Unterschieden zu suchen . Dazu wurden Fibroblastenkulturen mit Virus infiziert und 4 Tage p.i. elektronenmikroskopisch dargestellt. Sämtliche Infektionsexperimente wurden in 3fach wiederholt und mit dem morphologischen Erscheinungsbild von Wildtyp (WT) verglichen.

Bei mit WT infizierten Zellen beobachtete man die zuvor ausführlich beschriebene nukleäre Assemblierung des Virions, ein im Anschluss erfolgtes Verlassen des Zellkerns (Abbildung 22A) und große Mengen zytosolisch lokalisierten Kapsiden und Virionen (Abbildung 22B). Ein dem Wildtyp morphologisch äquivalentes Vermehrungsmuster zeigte sich bei den Mutanten von ORF M27 (IF4), M34 (IG11) und M47 (VIA1). Im Gegensatz dazu zeigten beide Mutanten im ORF M76 (IIF4, IIB1) eine nukleäre Akkumulation von Kapsiden (Abbildung 22C). In Zytosol waren dagegen nur bei längerer Durchsicht und nur in einzelnen Zellen Kapside zu beobachten (Abbildung 22D). Die Zahl nukleär lokalisierter, doppelt umhüllter Kapside war im Vergleich zum Wildtyp und im Vergleich zum Vermehrungsverhalten der anderen betrachteten Mutanten deutlich vermehrt (Abbildung 22E).

Bei der Mutante IVD5, bei welcher das Transposon in den ORF m165 inseriert ist, beobachtete man keine relevanten Veränderungen im Vermehrungsmuster des MCMV. Im Gegensatz zum Wildtyp und zu allen anderen Mutanten veränderte sich bei mit IVD5 infizierten Zellen die nukleäre Chromatinstruktur. So erscheint das Chromatin in allen diesen Zellen deutlich aufgelockerter und mit mehr Euchromatin im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 22F). Von

den Mutanten des ORF M32, M45 und M50 konnten keine ausreichenden Virustiter gewonnen werden, mit denen eine die Infektion äquipotent durchgeführt worden wäre.

3.4.6 Quantifizierung der genomischen Äquivalente von MCMV und MCMV-Mutanten in vitro

Die in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen beobachtete Anreicherung von MCMV im Nukleus bei Vorliegen einer Mutation im ORF M76 wurde mit einem homogenen PCR Assay (TaqMan™ –Technologie) quantifiziert. Nach Infektion von NIH3T3 Fibroblasten mit MCMV-Wildtyp, M32 und beiden M76 –Mutanten mit einer MOI von 0,1 wurden die Zellen 8h, 24h und 48 h p.i. geerntet und in eine zytosolische (C) bzw. eine nukleäre (N) Fraktio/n aufgetrennt. Für jede Fraktion wurde die Menge an MCMV-Genomäquivalenten bestimmt.

Tabelle 3. Beim MCMV Wildtyp fand sich nach 24 Stunden 7-fach mehr MCMV-DNA im Nukleus als im Überstand; nach 48 h war das Verhältnis mit 4:1 unverändert. Für die MCMV Mutante des ORF M32 konnte die stark eingeschränkte Virusreplikation sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden bestätigt werden. Für die MCMV Mutante des ORF M76 ließen sich zwar Genomäquivalente quantifizieren, die in ihrer Anzahl der des Wildtyps entsprechen. Sie waren jedoch auf das nukleäre Kompartiment konzentriert und nur in geringer Menge im zytosolischen Überstand nachweisbar (Verhältnis 210:1 bzw. 33:1).

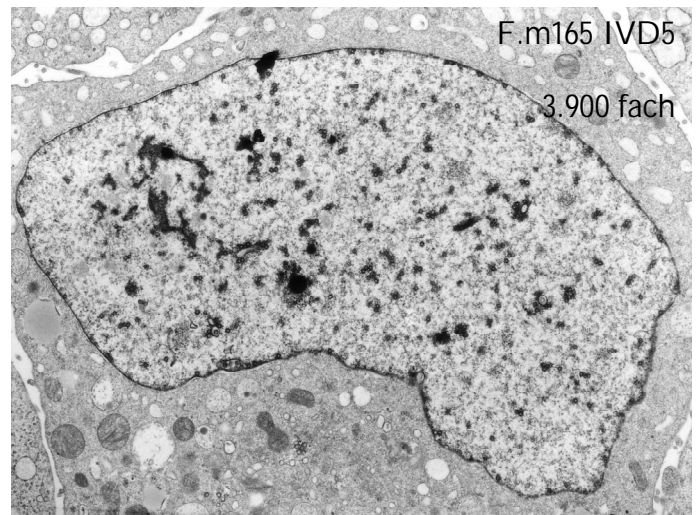
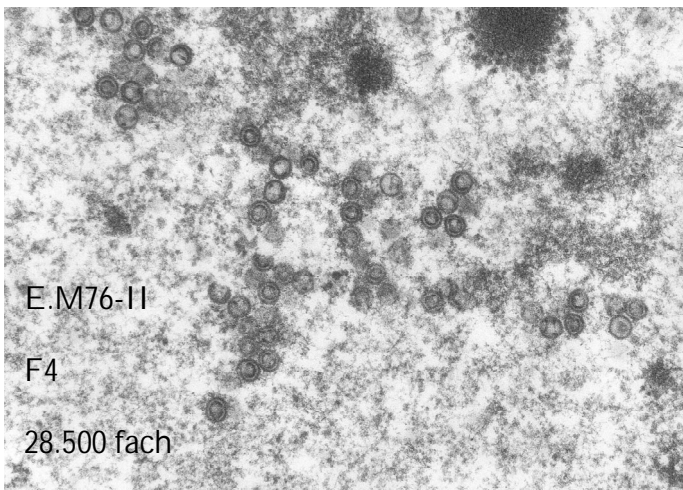
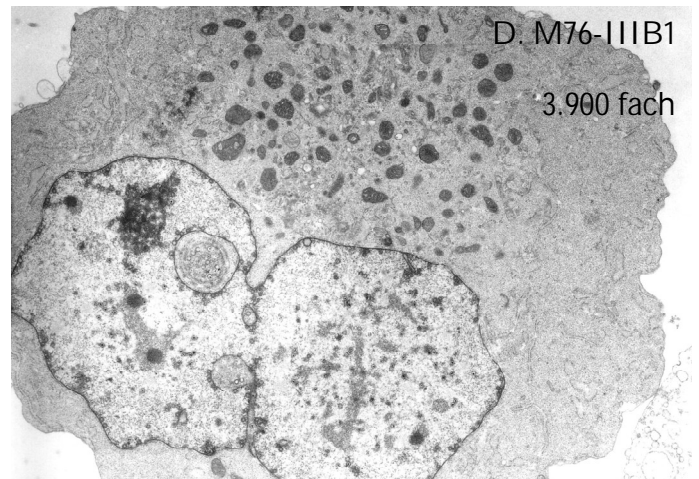
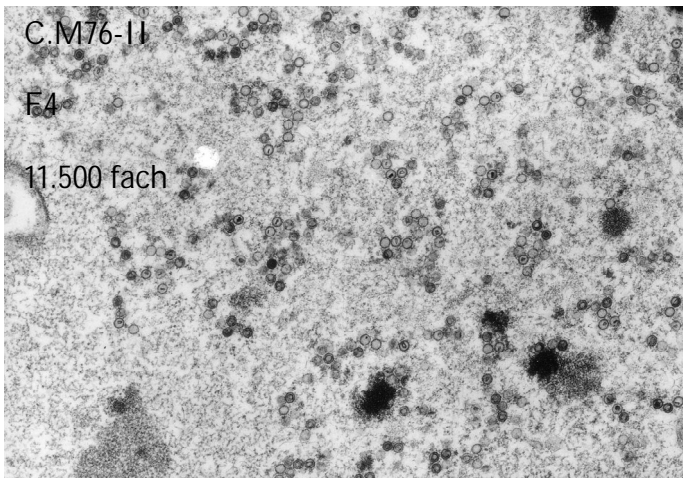
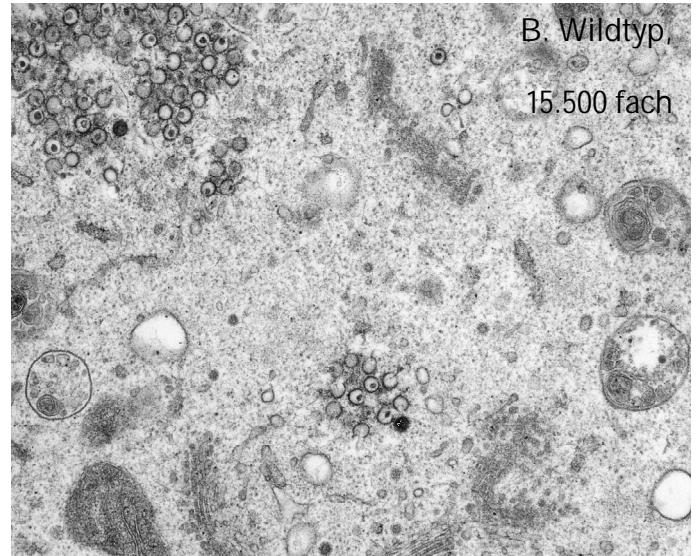
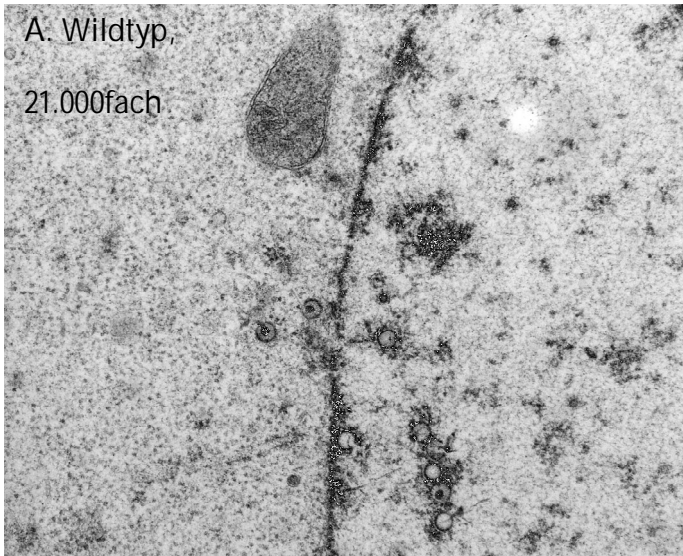
| | 24 h p.i. | | 48 h p.i. | | N:C Ratio | |
|--------------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|-------|
| | Nukleär | Zellulär | Nukleär | Zellulär | 24 h | 48 h |
| MCMV Wildtyp | 540.000 | 76.000 | 440.000 | 110.000 | 7,1:1 | 4:1 |
| M32 IV D 9 | 10.000 | 7.500 | 15.000 | 2.400 | 1,3:1 | 6:1 |
| M76 III B 1 | 310.000 | 120.000 | 1.200.000 | 5.700 | 2,6:1 | 210:1 |
| M76 II F 4 | 150.000 | 47.000 | 300.000 | 9.000 | 3,2:1 | 33:1 |

Tabelle 3. Messung genomischer MCMV Äquivalente von MCMV – Wildtyp, MCMV-M32-Mutante und MCMV-M76 Mutanten 24h und 48 h p.i. im zytosolischen (C) bzw. im nukleärem (N) Kompartiment mit TaqMan™ PCR

Seite 68:

Abbildung 22. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von NIH3T3 Fibroblasten, welche mit Wildtyp – MCMV und mit Transposon- Mutanten von M76 bzw. m165 infiziert worden sind.

Vergrößerung jeweils angegeben. A: Wildtyp – Virionen beim Durchtritt aus dem Nukleus (rechts) ins Zytosol (links). B: Ansammlungen von Virionen und Kapsiden im Zytosol (Wildtyp). C-E: Dichte nukläere Ansammlungen von Kapsiden bei der M76 Mutante, während im Zytosol auch bei längerer Durchsicht kaum Kapside zu finden sind. F: Aufgelockerte Chromatinstruktur bei der m165 Mutante. Weitere Einzelheiten siehe Text.



4. DISKUSSION

4.1 BAC Technologie: Insertionsmutanten und Deletionsmutanten.

4.1.1 Die homologe Rekombination von MCMV ist in E. coli einfacher durchführbar als in murinen Zellen.

Die Mutagenese ist ein essenzieller Bestandteil bei der Erforschung und der Analyse der Funktion viraler Gene. Mit der Klonierung von CMV als ein infektiöses bakterielles artifizielles Chromosom (BAC) können die bewährten, von Prokaryonten bekannten, biotechnologischen Methoden angewandt werden (23). Wegen der für ein Plasmid enormen Größe des artifiziiellen Chromosoms ist die einfache Mutagenese durch rekombinante Klonierung mittels Spaltung und Ligation allerdings nicht durchführbar. Der Umweg erfolgt durch homologe Rekombination. Für die Rekombination sind die Enzyme RecA und RecBCD notwendig (141), wobei üblicher Weise RecA in Laborstämmen von E. coli fehlt. Daher muss die genetische Information für RecA entweder transfiziert werden (140), oder temporär auf einem Shuttleplasmid eingebracht werden (25)(165), oder wie in dieser Arbeit ein E. coli Stamm verwendet werden, der konditionell RecA exprimiert. Die hier angewandte und ursprünglichen von Messerle (103) entwickelte Methode der homologen Rekombination bietet mehrere Vorteile im Vergleich zu homologer Rekombination in eukaryontischen Zellen:

- a) Wegen der kurzen Generationszeit der Bakterien ist sie um ein Vielfaches schneller und in einigen Wochen anstatt einigen Monaten durchführbar (23)
- b) Die Methode ist sicherer, weil adventive Deletionen oder die Ausbildung von inkorrekten rekombinanten Viren seltener beobachtet werden (150) und Helfereffekte ausgeschlossen werden können
- c) Auch Mutantengenome mit einem biologischen Nachteil können hergestellt werden, während dies in Zellkultur kaum möglich ist

Um Mutationen mittels homologer Rekombination einbringen zu können, müssen geeignete MCMV-Abschnitte gefunden und als Homologie in das Rekombinationsplasmid kloniert werden. Für eine durch *RecA* vermittelte Rekombination sind flankierende Sequenzhomologien mit je 2000 bp Länge wünschenswert. Hierfür eignen sich insbesondere die subgenomischen Abschnitte, die aus den Restriktionsfragmenten von MCMV hergestellt worden sind und in pACYC177 kloniert vorliegen (41). Sie wurden, je nach dem verwendeten Restriktionsenzym, HindIII-, EcoRI-, oder BamHI- Fragmente benannt und nach der Größe dem Alphabet entsprechend bezeichnet.

4.1.2 Bei der Rekombination müssen zwei Selektionsschritte ermöglicht werden: Kointegratbildung und Kointegratlösung.

Kointegratbildung: Die Herausbildung des Kointegrates war in allen in dieser Arbeit beschriebenen Rekombinationsstrategien problemlos durchführbar. Bei Analyse des Kointegrates zeigte sich gelegentlich eine höhere DNA-Konzentration in den Banden, die vom Insert gebildet worden sind, als in den zum MCMV BAC zugehörigen DNA-Banden. Eine mögliche Ursache hierfür ist die Ausbildung von Konkatameren. Dabei handelt es sich um eine Tandemisierung von DNA Molekülen in einer kovalenten Bindung (164). Das Phänomen verschwand aber bei der Auflösung der Kointegrate vollständig.

Kointegratlösung: Eine methodische Herausforderung ist die Resolution des Kointegrates im zweiten Schritt der Rekombination. Durch die Wahl von geeigneten Antibiotika wird die Ausbildung eines Kointegrates erzwungen und ist ein häufiges Ereignis. Für die Auflösung des Kointegrates besteht aber grundsätzlich kein Selektionsdruck und ist daher selten zu beobachten. Deshalb müssen unter Umständen mehrere Hundert Kolonien analysiert werden.

In dieser Arbeit wurde für die Herstellung von Kointegraten als Selektionsmarker ein temperaturabhängiges Resistenzgen verwendet. Für die Herstellung der Deletionsmutanten und der Revertanten wurde zudem ein Rekombinationsplasmid verwendet, welches *rpsL* (*strA*)

exprimiert. Das rpsL System basiert auf einem Gen von E. coli für ribosomales Protein S12. rpsL+ Bakterien können in Nährmedium, das Streptomycin enthält, nicht gedeihen (55). Durch dieses Suizidgen wurde ein Selektionsdruck hin zur Resolution ausgeübt. Die notwendige Anzahl der zu analysierenden Kolonien konnte so von den 500-1000 üblicherweise verwendeten auf 5-10 reduziert werden.

4.1.3 MCMV DNA wird in E. coli als BAC stabil gehalten und zeigt keine Hinweise für genetische Aberrationen im zeitlichen Verlauf.

Die bisher publizierten Erfahrungen sprechen dafür, dass BACs stabil bleiben, solange sie in Bakterienstämmen gehalten werden, in denen keine Rekombination stattfindet (138). Die MCMV-BAC Information ist aber für das Bakterium entbehrlich und deren stabile Aufrechterhaltung führt zu keinerlei biologischen Vorteilen. Man kann sich vorstellen, dass die repetitiven Sequenzen im CMV Genom (siehe auch Kapitel 1.2) eine präferenzielle Stelle für Rearrangements sein könnten (23). Kontrollen solcher ungewünschten, inzidenziellen Ereignisse sind deshalb wichtig. Größere Veränderungen oder Deletionen lassen sich durch Bandenanalyse nach Verdau mit Restriktionsenzymen identifizieren. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit sowohl die Kointegrate als auch die Mutanten mit mindestens zwei verschiedenen Restriktionsenzymen (i.d.R. HindIII, NotI, BamHI) analysiert. Kleine Alterationen (z.B. Deletion einzelner Basenpaare, Punktmutation) lassen sich nur durch Sequenzierung ausschließen. Bei einem 230kb großen Genom ist das mit den heute zur Verfügung stehenden Möglichkeiten unpraktikabel. Alternativ können zwei indirekte Methoden angewandt werden: (a) Prüfung der biologischen Fitness und (b) die Herstellung und Charakterisierung von Revertanten. Viren haben eine sehr hohe Dichte an kodierenden bzw. regulierenden Sequenzen akzidenzielle Veränderungen –sofern sie nicht essenzielle Gene betreffen –sollten häufig zu einem Nachteil in vitro oder in vivo führen (23). Es ist daher bemerkenswert und erfreulich, dass üblicherweise die Herpesvirus-BACs Wildtypeigenschaften besitzen (19)(140)(153). Auch für das murine

Gammaherpesvirus 68 konnten Wildtypeigenschaften des BAC-Klons nachgewiesen werden, jedoch erst, nachdem die BAC Kasette entfernt worden war. Die BAC Kasette verursachte hier z.B. niedrigere Gammaherpesvirus 68 - Titer während der akuten Infektion in der Lunge von Versuchstieren und eine geringer ausgeprägte Splenomegalie (2).

Wird bei einer Mutante ein abweichender Phänotyp gefunden, so ist die Herstellung einer Revertante erforderlich, um den Phänotyp der gefundenen Mutation zuordnen zu können (23). In dieser Arbeit wurden mittels homologer Rekombination Revertanten für die MCMV-Mutanten hergestellt, bei denen der Leserahmen von M32 und M76 trunziert war. Die Revertanten hatten die Eigenschaften von Wildtyp-MCMV.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mittels homologer Rekombination große DNA-Bereiche, d.h. auch >30 kbp, in einem Schritt aus dem BAC exzidiert werden können und dass die verkürzten BAC- Konstrukte in *E. coli* weiterhin stabil erhalten werden. Diese Beobachtung ist nicht trivial, weil auch denkbar wäre, dass es durch die große Schleifenbildung bei der Kointegration zu einer Destabilisierung der DNA kommen könnte. Die Deletionsmutanten führten *in vitro* zu keiner Nachkommenschaft von weiterem Virus, so dass postuliert werden kann, dass auch essenzielle Gene von der Deletion betroffen worden waren. Für m152 bis m159 ist bekannt, dass sie nicht essenziell sind (153). Eine Deletion der Basen 184079 – 217934, wie in dieser Arbeit durchgeführt, betrifft die ORF m126 bis m159. Für m142 und m143 wurde später vermittelt, dass sie essenziell für das Wachstum in Fibroblasten sind (101). Es ist sehr wahrscheinlich, dass diese ORFs grundsätzlich essenziell sind, weil Mutanten der ORF m137-m141 lebensfähig sind (28).

4.2 Virämie und DNAämie sind kein direktes Abbild der in Organen stattfindenden CMV- Replikation. Marker Proteine erhöhen die Aussagekraft.

4.2.1 Serologische CMV-Marker in der Grundlagenforschung bei der Infektion in vivo.

Mit der Herstellung der Reporterprotein-Insertionsmutante sowie der Etablierung der TaqMan™ PCR für MCMV wurden in dieser Arbeit zwei neue Methoden entwickelt, um die MCMV Infektion longitudinal in ein- und- demselben Versuchstier zu überwachen und auf diese Weise den Verbrauch von Versuchstieren zu reduzieren. Die Ergebnisse zeigen, dass man mit der Bestimmung eines Markers die zuverlässigere Aussage über die Infektion in Organen bekommt. Die Quantifizierung der viralen DNA korreliert weniger gut und die Quantifizierung einer Virämie mittels Zellkultur liefert nur unzuverlässige Aussagen. Diese Weiterentwicklung ist sinnvoll, weil bekannt ist, dass die Wirksamkeit einer immunsuppressiven Behandlung einerseits und einer antiviralen Therapie andererseits zwischen einzelnen Versuchstieren beträchtlich schwanken kann (22). Die Quantifizierung von Genomäquivalenten im Blut scheint mit der Virusaktivität nur bei starker Immunsuppression zu korrelieren; die Korrelation in lediglich B-Zell -defizienten Tieren ist hingegen schlecht.

4.2.2 Serologische CMV-Marker in der klinischen Anwendung.

Bei Übertragung dieser Beobachtung auf den Menschen ist zu folgern, dass das Blut ein separates Kompartiment der CMV Infektion darstellt und – wenn überhaupt – die quantifizierten DNA Äquivalente im Blut nur ein indirektes, unscharfes Bild der Virusreplikation in Organen reflektieren.

In klinischer Anwendung erfolgt heutzutage das Monitoring einer HCMV –Virusinfektion jedoch im Blut durch Detektion des Matrixproteins pp65 (ORF UL83) in Leukozyten (59). Dabei korreliert die Zahl pp65 -positiver Zellen mit dem Auftreten einer HCMV- Erkrankung (126).

Nachteile sind eine schlechte Standardisierung, und die Notwendigkeit der Messung innerhalb von 8 Stunden nach Blutentnahme. Eine ausreichende Zahl von Leukozyten ist Voraussetzung für diesen Test, was bei Knochenmarktransplantierten nach konditionierender Therapie nicht immer gegeben ist (88). Der Nachweis und die Quantifizierung von HCMV DNA in Vollblut oder im Plasma eignet sich jedoch zur schnellen Diagnose der HCMV Infektion wie auch zur Überwachung des klinischer Verlaufs und des Ansprechens auf eine antivirale Therapie (47), (88), (89). Die DNAämie und die Antigenämie korrelieren dabei in aller Regel. Diesen Methoden ist im Vergleich zur Bestimmung von Anti- CMV IgG bzw. IgM der Vorzug zu geben, weil bei immunsupprimierten Patienten die humorale Immunantwort unzuverlässig ist (46).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen auch, dass ein negatives Ergebnis nicht zwangsläufig das Vorliegen einer CMV Infektion ausschließen muss. Daher muss bei klinischem Verdacht und bei Risikopatienten in anderen leicht gewinnbaren Materialien, z.B. Rachenspülwasser, Bronchialsekret oder Stuhl nach HCMV gesucht werden. Entsprechende PCR Methoden stehen in spezialisierten virologischen Laboratorien zur Verfügung. Notwendig ist auch die Entwicklung von weiteren Verfahren, die mit einer höheren Präzision die klinische Verwertbarkeit eines HCMV- Nachweises belegen. Jüngste Entwicklungen hierbei sind z.B. zellgebundene Assays, welche die spezifische zelluläre Immunantwort des Wirtes auf HCMV abbilden und quantitativ darstellen können (z.B. Immunospot) (65). Dies ist wichtig, weil immer mehr Hinweise dafür sprechen, dass spezifische CD8(+) T-Zellen für einen lang anhaltenden Schutz vor CMV sorgen (76). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass virusspezifische sezernierte Proteine eine hochsensitive Möglichkeit wären, die CMV Infektion rasch zu erkennen. Bisher gibt es aber noch keine evaluierten Testsysteme für solche Proteine. Ein mögliches Ziel wäre das virale Glykoprotein R27080 (Produkt des ORF R27080 alias UL21.5 von HCMV), von dem gezeigt werden konnte, dass es im Überfluss in Zellkultur von HCMV-infizierten Fibroblasten sezerniert wird (112).

4.3 Transposons: klassische und reverse Genetik

Die Methode der Transposon- Mutagenese, die in der bakteriellen Genetik seit fast zwei Dekaden Anwendung findet, lässt sich auf das bakterielle artifizielle Chromosom von MCMV anwenden (9). Durch die (grundsätzlich an zufälliger Stelle erfolgende) Insertion eines Transposons können Mutantenbibliotheken erzeugt werden. Mit einem geeigneten Suchverfahren können dann Phänotypen identifiziert werden, die sich vom Wildtyp unterscheiden, und so der Genotyp gefunden werden (23). Neben diesen „klassisch genetischen“ Ansatz ist es auch möglich, die Bibliothek auf genetischer Ebene gezielt nach geeigneten Mutanten zu durchsuchen und dann den Phänotyp der Mutante zu charakterisieren („invers genetischer“ Ansatz) (68). Die Identifikation des Insertionsortes im BAC erfolgt mittels direkter Sequenzierung, weil Erkennungsstellen von geeigneten Primern in das Transposon integriert worden sind (30).

In dieser Arbeit wurde für die Transposon – Mutagenese das Plasmid pTsTM16 verwendet, das aus pTsTM8 rekombinant hergestellt wurde. pTsTM16 enthält ein Transposon aus der Tn3-Familie und bevorzugt daher für die Transposition negativ verdrillte („negatively supercoiled“) Plasmide (9). Daher erfolgt die Transposition überwiegend in MCMV-BAC und nur selten in das E.coli Genom. Von seinem Ursprungsplasmid pTnMax8 unterscheidet es sich durch zwei Eigenschaften. Zum einen wird durch die Insertion von rep^s ein Mechanismus integriert, welcher die Replikation des Plasmides nur bei 30°C, aber nicht bei 42°C ermöglicht. Nach Transposition verlieren bei 42° kultivierte Bakterien die nicht integrierten pTsTM16 Plasmide (25)(120). Zum anderen beinhaltet pTsTM16 das GFP Gen unter Kontrolle mit dem HCMV immediate-early Promoter des Plasmids pEGFP-CI (20). Damit wird in der Zellkultur die mit einer Transposon-Mutante infizierte Zelle unter dem Fluoreszenzmikroskop einfach identifizierbar, weil sie sich von der nicht infizierten Zelle durch ein grünes Fluoreszenzsignal unterscheidet. Eine starke GFP Expression allein könnte theoretisch das Viruswachstum negativ beeinflussen. Bei Mutanten, welche GFP exprimieren und im Vergleich zum Wildtyp eine nur geringfügige Wachstumsretardierung zeigen, sollte der Vergleich der Wachstumskurven daher am besten mit

einer anderen GFP Mutante erfolgen, von der bekannt ist, dass sie ein Wachstumsverhalten wie Wildtyp zeigt (101). Die ausgeprägte Attenuierung der hier untersuchten Mutanten geht aber weiter über das Maß hinaus, welches man vom GFP allein erwarten könnte.

Analysiert man Bakterienklone, welche das MCMV-BAC enthalten, nach Transposon-Insertion, kann man bei ~90 % der Kolonien eine Transposition ins BAC feststellen (25). Bei drei der 19 in dieser Arbeit näher analysierten Mutanten fanden sich mehrfache Transposon-Insertionen, die eine Sequenzierung verhinderten und daher nicht näher analysiert wurden. Mehrfachinsertionen bedeuten einen Selektionsvorteil, weil mit dem Transposon auch jeweils eine Kopie des Antibiotika- Resistenzgens übertragen wird. Für pTsTM16 ist dies ein seltenes Ereignis, weil die Resistenz gegenüber Kanamycin bereits nach einem Insertionsereignis fast vollständig ist. Bei Verwendung von (schwächeren) Resistenzgenen gegen andere Antibiotika (z.B. Tetracyclin) wurden Mehrfachinsertionen häufiger beobachtet (68). Ferner implizierte das Suchkriterium „langsameres Wachstum in Fibroblasten“ eine positive Selektion von Mutanten mit Wachstumsdefiziten. Bei Mehrfachinsertionen ist aber die Wahrscheinlichkeit einer Beeinträchtigung eines wachstumsrelevanten Gens erhöht. Das erklärt zusätzlich die erhöhte Anzahl von Mehrfachinsertionen, die in dieser Arbeit gefunden wurden (3 von 19).

4.4 Die Zerstörung des ORFs von M32, M34, M45, M47, M50, M76 und m165 führt zu einem attenuiertem Wachstum in Fibroblasten

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Unterbrechung der ORF von M32, M34, M45, M47, M50, M76 sowie von m165 zu einem attenuiertem Wachstum in Fibroblasten in vitro führt.

Die Funktion von M32. Über die genaue Funktion von M32 ist bisher wenig bekannt, mehr jedoch über die Lokalisation des durch M32 kodierten Proteins, eines Tegumentproteins von 150 kDa Größe (pp150). pp150 induziert bei Vakzinierung von Mäusen in keine spezifische immunologische Antwort von CD8(+)-T-Lymphozyten (109). Von dem HCMV Homolog, UL32 (mit einem immunogenen Protein pp150 als Produkt), ist bekannt, dass die pp 150

Expression spät während der zytoplasmatischen Reifung von HCMV beginnt und pp150 72 h p.i. im Zytoplasma nachweisbar ist (66). Wird das Transkript von UL32 mittels Antisense -RNA inhibiert, zeigen sich ultrastrukturell keine Unterschiede in den nukleären HCMV Nukleokapsiden. Im Zytoplasma fehlen jedoch DNA -haltige C Kapside und Virionen; statt dessen werden abnorme Formen von nicht infektiösen, umhüllten Partikeln beobachtet (94). In dieser Arbeit konnte kein Unterschied in der DNA-Menge zwischen Nukleus und Zytoplasma bei der M32 Mutante beobachtet werden. Es ist möglich, dass pp150 daher eine Funktion bei der Stabilisierung von Kapsiden im Zytoplasma besitzt. Diese Hypothese wird bestätigt durch die Studien von Sanchez et al., wo pp150 während des replikativen Zyklus in einer festen Struktur innerhalb des Zytoplasmas verblieb (132). Es lässt sich somit vermuten, dass – vermittelt unter anderem durch pp150 – im Zytoplasma Virionen assembliert werden und das die Destruktion des für pp150 kodierenden ORF zu einem schweren Replikationsdefizit führt.

Die Funktion von M34. Der ORF M34 war bei MCMV noch nicht untersucht. Von seinem HCMV Homologen UL34 (und dem kodierten Protein pUL34) ist bekannt, dass es einen Repressor der US3 Expression darstellt. pUL34 bindet an ein repressives Element für die Transkription von US3 in vitro. pUL34 ist im Zellkern lokalisiert (83). Bei seiner Funktion als Transkriptionsfaktor ist es verständlich, dass in dieser Arbeit keine ultrastrukturellen Unterschiede bei der M34-Mutante gesehen worden sind.

Die Funktion von M45. M45 hat Homologie mit der großen (R1) Untereinheit der Ribonukleotid -Reduktase (122), hat aber keine entsprechende biologische Funktion (86). M45-Mutanten wachsen in Fibroblasten weitgehend normal, haben aber ein ausgeprägtes Wachstumsdefizit in Makrophagen und können sich in Endothelzellen überhaupt nicht vermehren (21). Das zu M45 homologe Protein UL45 von HCMV hat möglicherweise keine vergleichbare Bedeutung für die Replikation von HCMV in humanen Endothelzellen, da eine UL45-Deletionsmutante keinen Wachstumsdefekt in Umbilikalvenen-Endothelzellen zeigte (61).

In der hier analysierten Mutante ist das Gen für GFP in inverser Orientierung zu den Genen M44 – M46. Dadurch entsteht vermutlich ein antisense-Effekt zum benachbarten M46, welches die Expression von M46 drosselt. M46 ist für die Replikation von MCMV essentiell (52).

Die Funktion von M47. Für M47 lässt sich aus dem 1040 bp großen Codon ein 118,1 kDa schweres Protein vorhersagen (125). Es wurden bisher keine weiteren Untersuchungen zu M47 veröffentlicht. Das HCMV Homolog, UL47, wird in der späten Phase (72 h p.i.) der Infektion exprimiert (71). HCMV, bei dem UL47 deletiert ist, repliziert bis zu 100-fach langsamer in Fibroblasten und aus diesem Replikationsdefizit von UL47 Mutanten resultiert kein Defekt bei Eindringen der Viren in die Fibroblastenzelle. Nachdem UL47 die Transkription von immediate-early Genen verzögert, wird vermutet, dass UL47 in dem Prozess der DNA-Freisetzung aus dem Virion nach Infektion eingreift (8). Die in der vorliegenden Arbeit generierten Ergebnisse zeigen ebenso ein deutliches Wachstumsdefizit von M47 Mutanten, ohne dass ultrastrukturelle Veränderungen beobachtet werden konnten.

Die Funktion von M50. Das M50 Gen kodiert für ein transmembranes 35-kDa Protein welches mit dem viralen Apparat assoziiert ist, der für den Austritt von MCMV aus dem Zellkern verantwortlich ist (113). M50 Homologe lassen sich in allen Herpesviridae identifizieren und sind, z.B. bei HSV-1, bei diesen ebenso für das Verlassen des Zellkerns verantwortlich. Das Protein M50/p35 ist an der inneren Kernmembran lokalisiert; das M50 Gen galt lange Zeit als essenziell. Jüngst konnte durch Analyse von >100 Mutanten von M50 gezeigt werden, dass insbesondere der N-Terminus von M50 für die Funktion essenziell ist, während große Teile des C-Terminus deletiert werden können, ohne dass es zu einem Funktionsverlust kommt (26). Die in dieser Arbeit verwendete Mutante von M50 wies das größte Wachstumsdefizit aller analysierten Mutanten auf. Es konnten aber einzelne Zellen identifiziert werden, bei welchen es zu einer eindeutig nachweisbaren Expression von GFP nach Infektion mit der M50 Mutante kam. Möglicher Weise wird unter Abwesenheit von M50 MCMV daran gehindert, den Zellkern zu verlassen und weitere infektiöse Partikel zu bilden, welche andere Zellen infizieren können.

Die Funktion von M76. Über die Funktion des HCMV ORF M76 war bisher nichts bekannt. pUL76 (38 kDa), das Produkt des HCMV Homologen, UL76, reguliert (wie auch andere zellspezifische Transkriptionsfaktoren und virale Proteine (pUL69, pUL82 und pUL84) die Expression des "major immediate-early promoter/enhancer" (MIEP, siehe auch Kapitel 1.3). pUL76 ist im reproduktiven Zyklus von HCMV -infizierten Zellen vom „immediate-early“ Stadium bis zum "late" Stadium nachweisbar und scheint selektiv nukleär lokalisiert zu sein (156). Der Nachweis bereits im „immediate early“ Stadium spricht dafür, dass pM76 ein Bestandteil des Virions ist. Die Beobachtungen von Wang et al. (156) sind konsistent mit dem Ergebnis dieser Arbeit, die ein Exportdefizit von M76 Mutanten aus dem Nukleus nahelegen konnte. Es ist zu vermuten, dass es einen regulatorischen Mechanismus gibt, der bestimmt, wann Kapside die Reife haben, den Nukleus verlassen zu können und dass M76 hier eine wesentliche Rolle spielt.

Die Funktion von m165. Über die weitere Funktion von m165, einem ORF, der keine Homologie zu HCMV aufweist, ist nichts bekannt. Für den nur 332 bp langen ORF lässt sich ein 35,8 kDa schweres Protein vorhersagen; möglicherweise handelt es sich um ein membranständiges Glykoprotein (125). Gezielte Deletionen von m165 und der benachbarten ORFs zeigten allerdings kein Wachstumsdefizit. Daraus lässt sich vermuten, dass das Wachstumsdefizit der m165-Transposon-Mutante wahrscheinlich auf eine zufällige Mutation an anderer Stelle des Virusgenoms zurückzuführen ist (W. Brune, Würzburg, persönliche Mitteilung).

M27 Mutanten haben keine Attenuierung des Wachstums. Bei der qualitativen Analyse der Virusvermehrung aller Transposon- Mutanten der BAC- Bibliothek wurden auch drei Mutanten registriert, bei denen jeweils der ORF M27 von der Insertion betroffen war. Bei der semiquantitativen Beobachtung war die Virusausbreitung in Fibroblasten jedoch mit Wildtyp vergleichbar und bei der quantitativen Untersuchung im Vergleich zum Wildtyp nicht signifikant vermindert. Dies ist konsistent mit den Beobachtungen von Abenes et al. Dort führte die M27-

Mutante nur in vivo zu einer Attenuierung von Wachstum und Virulenz führt, während in vitro kein Unterschied zu Wildtyp beobachtet wurde (1).

4.5 Ausblick: Gene, die in vitro entbehrlich sind, spielen eine wesentliche Rolle bei der Virus- Wirt- Interaktion

Für ein Wachstum in Zellkultur sind viele CMV Gene offensichtlich entbehrlich. Ihre Anwesenheit im viralen Genom weist darauf hin, dass sie eine in vivo Funktion bei der Modulation von Interaktionen zwischen Virus und Wirt besitzen. Einige nicht-essenzielle Gene wurden bereits beschrieben. Z. B. führt HCMV US11 zu einer Herabregulierung der Expression und Präsentation von MHC-Klasse I Molekülen (161). MCMV ORF m133, der bestimmende Faktor für MCMV Replikation in Speicheldrüsen, ist ebenso entbehrlich in vitro (82). Ähnliches gilt auch für M43. Hier führt die Destruktion des ORF mittels Transposoninsertion zu 100-1000 fach niedrigeren Virustitern in Speicheldrüsen im Vergleich zu Wildtyp (163). Eine andere Studie an Transposon-Mutanten zeigte, dass M43 und andere Mitglieder der US22 Familie (M36, m139, m140, m141) den MCMV Tropismus für Markophagen beeinflussen (101). ORF M83 kodiert ein in großer Menge vorkommendes Tegumentprotein, welches zwar für die in vitro Replikation nicht nötig ist, aber notwendig für eine effiziente Replikation und Virulenz in vivo (110).

Mittels Mutanten innerhalb eines ORF und der Analyse des Verhaltens der Virusmutanten in vitro und in vivo konnte in den letzten Jahren die Funktion verschiedener Gene von HCMV und MCMV vermittelt werden. Endothelzellen, die mit M45-MCMV-Transposonmutanten infiziert werden, werden rasch der Apoptose zugeführt. Es ist wohl eine Strategie des murinen CMV, der Zerstörung der Wirtszelle durch M45-vermittelte Hemmung von zellulärer Apoptose zu entgehen (21). Im Gegensatz dazu zeigt die Transposonmutante von UL45 (HCMV) auch ein Wachstumsdefizit in Fibroblasten. Die Zellen waren nur moderat sensitiv gegenüber FAS-induzierter Apoptose. Bei HCMV konnte für UL45 die herausragende antiapoptotische Funktion nicht gezeigt werden (117). Der Unterschied zwischen M45 und UL45 zeigt, dass Erkenntnisse

aus dem Mausmodell nicht immer auf HCMV übertragen werden können. Vor einer klinischen Umsetzung müssen solche Daten an HCMV reproduziert werden. Zudem müssen die in vitro gewonnenen Erkenntnisse mit den tatsächlich beobachteten klinischen Daten korreliert werden. Kürzlich hat sich nämlich gezeigt, dass UL45 bei klinischen HCMV – Isolaten durchaus eine anti-apoptotische Wirkung hat (Prof. Koszinowski, München, pers. Mitteilung).

Die Transposoninsertion führt zu einer Zerstörung des Leserahmens und in der Folge zu einer Trunkierung des translatierten Proteins. Die Forderung nach einer kompletten Deletion eines gesamten ORF zur sicheren kausalen Verknüpfung von Phänotyp und genetischer Ursache führt zu neuen Problemen. Durch die Deletion können auch regulatorische Sequenzen betroffen werden, welche die Funktion anderer Gene beeinflussen können (5). Eine verbesserter Ansatz ist die Betrachtung von mehreren Mutationen an unterschiedlichen Stellen des Leserahmens (68), wie sie in dieser Arbeit für M27, M47 und M76 Mutanten gezeigt wurde.

4.6 ORF M76 und Exportdefizit von MCMV aus dem Nukleus

Die Elektronenmikroskopie (EM) als schnelle und effektive Methode der visuellen Darstellung von den von Robert Koch definierten „ultravisiblen“ Agenzien (80) förderte die Virologie seit der Erstbeschreibung von Pockenviren im Jahr 1938 (17) in den Jahren 1950-1980, verlor aber in letzter Zeit mit der zunehmenden Entwicklung von molekularbiologischen Techniken an Bedeutung. Diese Entwicklung wurde vielfach bedauert (50). Nicht nur für die Grundlagenforschung sondern auch für die klinische virologische Diagnostik sind EM-Techniken unverzichtbar. Z.B. kann Humanes Papillomvirus (HPV) mittels EM hochspezifisch im Urin von Knochenmarktransplantierten diagnostiziert werden (12), und sie stellt oftmals die Methode der Wahl bei der Differenzierung von Erregern dar, wie sie in B-Waffen Einsetzung finden könnten(49)(64)(90). Die Vorteile von EM sind eine schnelle Darstellbarkeit von bis zum 10 nm kleinen Strukturen durch die direkte Präparation der Zellen und die Darstellung der morphologischen Eigenschaften von Erreger und Wirt im Sinne einer anschaulichen Diagnostik,

wobei die beobachtete Morphe eine innere Qualitätskontrolle darstellt (49). Durch die Beobachtung von Veränderungen von Strukturmerkmalen wie Größe, Form und Feinstruktur lassen sich Hinweise auf die zugrundeliegende genetische Ursache geben, weil morphologische Merkmale eine genetische Ursache haben.

In der vorliegenden Arbeit konnten durch die EM Hinweise darauf gefunden werden, dass die Schädigung der ORF M76 im MCMV ein Exportdefizit des Virus aus dem Zellkern verursacht. Durch Herstellung von markierten, spezifischen Antikörpern, ließe sich zukünftig mittels Immun-EM die genaue Lokalisation von M76 ableiten und so aufgrund des morphologischen Erscheinungsbildes die Genfunktion vermuten (14).

4.7 Ausblicke und Perspektiven

Mit der Sequenzierung viraler Genome und auch des humanen Genoms steht eine immense genetische Datenflut zur Verfügung und muss in sinnvolle Information zur Funktion einzelner Gene übertragen werden (23). Dazu sollte diese genetische Information in einer veränderbaren Form vorliegen, z.B. als artifizielles Chromosom. Die Charakterisierung der Funktion erfolgt durch rekombinantes Klonieren auf BAC- Niveau durch den Austausch von homologen viralen Genen (29) oder durch Expression einzelner Gene (162). So konnte mit BAC Technologie der MCMV- Enhancer rezeptiert und durch den HCMV- Enhancer ersetzt werden und gezeigt werden, dass MCMV ohne Enhancer ein Wachstumsdefizit besitzt und dieses durch die den HCMV- Enhancer komplementiert werden kann (5). Denkbar ist auch das Markieren von Genen durch tags (113) oder die Fusion von Genen mit fremden Operons (145).

Als BAC klonierte Viren könnten auch – als Bestandteil von attenuierten Bakterien als Träger – als multivalente Vakzine verwendet werden. Erste tierexperimentelle Ergebnisse sind vielversprechend. MCMV-BAC wird stabil in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium gehalten und eine Infektion mit diesem Bakterium induziert in Mäusen eine CMV-Infektion (33).

Eine der interessantesten Anwendungen ist die Verwendung von Herpesviren für den Gentransfer (44). Herpesviren eignen sich hierfür, weil sie durch ihre enorme Größe große DNA Mengen aufnehmen können und sie eine große Anzahl nicht-essenzieller Gene besitzen, die durch therapeutische Gene ausgetauscht werden könnten.

Für CMV im speziellen sind hämatologische Progenitorzellen eines der wesentlichen Zielorgane, weil das CMV Genom in der latenten Phase der Infektion in diesen Zellen persistiert (62)(102). CMV könnte daher gut als Vektorsystem für die Gentherapie von kongenitalen und erworbenen hämatopoetischen Erkrankungen dienen (18). Hierfür kann mit der BAC Technologie die Klonierkapazität von CMV bestimmt werden, und dann in einem zweiten Schritt eine geeignete Zelllinie generiert werden, welche replikationsdefiziente Vektoren produziert. Ziel könnte die Herstellung von leeren Amplikons (engl. gutless amplicon) sein. Zur Vorhersage der Effekte eines solchen CMV Skeletts ist es wichtig, die Funktion jedes einzelnen der herpesviralen Gene verstehen zu lernen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das humane Zytomegalievirus (HCMV) ist ein speziesspezifisches, humanpathogenes Herpesvirus. Ein etabliertes System zur Untersuchung der CMV-Infektion *in vivo* ist das murine Zytomegalievirus (MCMV). Das 230 kb große Genom von MCMV liegt seit kurzem als bakterielles artifizielles Chromosom (BAC) kloniert vor. Damit eröffnen sich neue Strategien für gentechnologische Untersuchungen, die Gegenstand dieser Dissertation sind: Mit homologer Rekombination in *E. coli* und mit Transposonmutagenese wurden Insertionsmutanten und Deletionsmutanten des MCMV hergestellt und in NIH 3T3 Fibroblasten *in vitro* sowie BALB/c Mäusen *in vivo* charakterisiert.

Insertionsmutanten: Zwei verschiedene sezernierbare und quantitativ nachweisbare Markergene (HBsAg; SEAP) wurden jeweils so in das MCMV-Genom inseriert, dass sie im Rahmen einer Infektion *in vitro* wie auch *in vivo* zur Expression kommen. Im Versuchstier korrelierte die Menge der in das Serum sezernierten Marker hochgradig mit den Virustitern in Milz und Leber. Die Markersekretion wurde mit einer hierfür neu etablierten quantitativen PCR-Methode (TaqMan™) bezüglich der Sensitivität verglichen. Bei immunkompetenten Mäusen war SEAP – vor der PCR und der Virusbestimmung - das empfindlichste Nachweisverfahren. Die entwickelten Methoden erlauben erstmals die longitudinale Beobachtung einer MCMV-Infektion in ein- und- demselben Versuchstier.

Deletionsmutanten: Das Wachstumsverhalten von 576 MCMV-Transposon-Mutanten in Fibroblasten wurde analysiert. Identifiziert wurden 19 Mutanten mit wachstumsdefizitären Phänotypen, denen Veränderungen von sechs offenen Leserahmen (ORF) zugrunde lagen. Eine Trunkierung eines dieser bisher nicht näher definierten, offensichtlich nicht essentielle Gene, bewirkt ein signifikantes, quantifizierbares Wachstumsdefizit. Mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass bei MCMV die Destruktion des Leserahmens M76 ein Exportdefizit aus dem Zellkern zur Folge hat.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Abenes, G., Lee, M., Haghjoo, E., Tong, T., Zhan, X., Liu, F. (2001). Murine cytomegalovirus open reading frame M27 plays an important role in growth and virulence in mice. *J. Virol.* 75, 1697-1707.
- (2) Adler, H., Messerle, M., Koszinowski, U.H. (2001). Virus reconstituted from infectious bacterial artificial chromosome (BAC)-clones murine gammaherpesvirus 68 acquires wild-type properties in vivo only after excision of BAC vector sequences. *J. Virol.* 75, 5692-5696.
- (3) 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: 6964-6974
- (4) Adler, S.P. (1983). Transfusion-associated cytomegalovirus infections. *Rev. Infect. Dis.* 5, 977-993.
- (5) Angulo, A., Messerle, M., Koszinowski, U.H., Ghazal, P. (1998). Enhancer Requirement for Murine Cytomegalovirus Growth and Genetic Complementation by the Human Cytomegalovirus Enhancer. *J Virol.* 72, 8502-8509.
- (6) Barbeyron, T., Mars, M., Schroeder, E., Malpiece, Y., Plucienniczak, A., Beaud, G., Streeck, RE. (1987). Identification of vaccinia promoters by heterologous expression of hepatitis B surface antigen in mouse cells by recombinant vaccinia viruses. *Biochimica Biophysica Acta* 910: 240-244.
- (7) Baldanti F., Revello M.G., Percivalle E., Gerna G. (1998). Use of the human cytomegalovirus (HCMV) antigenemia assay for diagnosis and monitoring of HCMV

infections and detection of antiviral drug resistance in the immunocompromised. *J. Clin. Virol.* 11, 51-60.

- (8) Bechtel J.T., Shenk T. (2002). Human cytomegalovirus UL47 tegument protein functions after entry and before immediate-early gene expression. *J. Virol.* 76, 1043-1050.
- (9) Berg, C.M., Berg, D.E., Groisman, E.A. (Hrsg.,1989). *Mobile DNA*. American Society of Microbiology, Washington, DC, USA, 879-925.
- (10) Berger, J., Hauber, J., Hauber, R., Geiger, R., Cullen, B.R.. (1988). Secreted placental alkaline phosphatase : a powerful new quantitative indicator of gene expression in eucaryotic cells. *Gene* 66, 1-10.
- (11) Bettan M., Darteil R., Scherman D. (1999). Secreted human placental alkaline phosphatase as a reporter gene for in vivo gene transfer. *Anal Biochem* 271, 187-189.
- (12) Biel, S.S., Nitsche, A., Kurth, A., Siegert, W., Ozel, M., Gelderblom, H.R. (2004). Detection of human polyomaviruses in urine from bone marrow transplant patients: comparison of electron microscopy with PCR. *Clin. Chem.* 50, 306-312.
- (13) Biel, S.S., Gelderblom, H.R.. (1999) *Electron microscopy of viruses*. In: Cann, A.J. (Hrsg.). *Virus culture- a practical approach*. Oxford university press, Oxford, Großbritannien, 111-147.
- (14) Biel, S.S., Gelderblom, H.R. (1999). Diagnostic electron microscopy is still a timely and rewarding method. *J. Clin. Virol.* 13, 105-119.
- (15) Biery, M.C., Stewart, F.J., Stellwagen, A.E., Raleigh, E.A., Craig, N.L. (2000) A simple in vitro Tn7-based transposition system with low target site selectivity for genome and gene analysis. *Nucleic Acids Res.* 28: 1067-1077.

- (16) Bronstein, I., Martin, C.S., Fortin, J.J., Olesen, C.E., Voyta, J.C. (1996) Chemiluminescence: sensitive detection technology for reporter gene assays. *Clin Chem* 42, 1542-1546.
- (17) Von Borries, B., Ruska, E., Ruska, H. (1938). Bakterien und Virus in überlichtmikroskopischer Aufnahme. *Klin. Wochenschr.* 17, 1713 –1717.
- (18) Borst, E., Messerle, M. Development of a cytomegalovirus vector for somatic gene therapy. (2000). *Bone Marrow Transplant.* 25, Suppl. 2, S80 –S82.
- (19) Borst, E.M., Hahn, G., Koszinowski, U.H., Messerle, M. (1999). Cloning of the human cytomegalovirus (HCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*: A new approach for construction of HCMV mutants. *J. Virol.* 73, 8320-8329.
- (20) Brune W. (2002). Random transposon mutagenesis of large DNA molecules in *Escherichia coli*. *Methods Mol. Biol.* 182, 165-171.
- (21) Brune, W., Menard, C., Heesemann, J., Koszinowski, U.H. (2001). A ribonucleotide reductase homolog of cytomegalovirus and endothelial cell tropism. *Science* 291, 303 –305.
- (22) Brune, W., Hasan, M., Krych, M., Bubic, I., Jonjic, S., Koszinowski, U.H. (2001). Secreted virus-encoded proteins reflect murine cytomegalovirus productivity in organs. *J. Infect. Dis.* 184, 1320 - 1324.
- (23) Brune, W., Messerle, M., Koszinowski, U.H. (2000) Forward with BACs - new tools for herpesvirus genomics. *Trends Genetics* 16, 254-258.

- (24) Brune, W., Hengel, H., Koszinowski, U.H. (1999). A mouse model for cytomegalovirus infection, unit 19.7. In Coligan, J.E., Kruisbeek, A.M., Margulies, D.H., Shevach, E.M., Strober, W. (Hrsg.). Current protocols in immunology. John Wiley, New York, USA. 1-13.
- (25) Brune, W., Menard, C., Hobom, U., Odenbreit, S., Messerle, M., Koszinowski, U.H. (1999). Rapid identification of essential and nonessential herpesvirus genes by direct transposon mutagenesis. *Nature Biotechnol.* 17, 360-364.
- (26) Bubeck, A., Wagner, M., Ruzsics, Z. et al. (2004). Comprehensive mutational analysis of a herpesvirus gene in the viral genome context reveals a region essential for virus replication. *J. Virol.* 78, 8026-8035
- (27) Cardin, R.D., Abenes, G.B., Stoddart, C.A., Mocarski, E.S. (1995). Murine cytomegalovirus IE2, an activator of gene expression, is dispensible for growth and latency in mice. *Virology* 209, 236-241.
- (28) Cavanaugh, V.J., Stenberg, R.M., Staley, T.L. et al. (1996). Murine cytomegalovirus with a deletion of genes spanning HindIII-J and -I displays altered cell and tissue tropism. *J Virol.* 70, 1365-1374.
- (29) Chang, W. L., Barry, P. A. (2003). Cloning of the full-length rhesus cytomegalovirus genome as an infectious and self-excisable bacterial artificial chromosome for analysis of viral pathogenesis. *J Virol.* 77, 5073 - 5083.
- (30) Chatterjee, P.K., Yarnall, D.P., Haneline, S.A. et al. (1999). Direct sequencing of bacterial and P1 artificial chromosome-nested deletions for identifying position-specific single-nucleotide polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 9, 13276 - 13281.

- (31) Chee, M.S., Bankier, A.T., Beck, S., et al. (1990). Analysis of the protein coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr. Topics Immunol.* 154, 125-169.
- (32) Chen, D.H., Jiang, H., Lee, M., Liu, F., Zhou, Z.H. (1999). Three-dimensional visualization of tegument/capsid interactions in the intact human cytomegalovirus. *Virology.* 20, 10 - 16.
- (33) Cicin-Sain, L., Brune, W., Bubic, I., Jonjic, S., Koszinowski, U.H. Vaccination of mice with bacteria carrying a cloned herpesvirus genome reconstituted in vivo. *J Virol* 77, 8249-8255.
- (34) De Clerq E. (1998). Antiviral agents that are active against CMV : Potential of cidofovir for the treatment of CMV and other virus infections. In Scholz M. (Hrsg.). *CMV-related immunopathology.* Karger, Basel, Schweiz. 262-269.
- (35) Cullen, B.R. (2000). Utility of the secreted placental alkaline phosphatase reporter enzyme. *Methods Enzymol.* 326, 159-164 .
- (36) Cullen, B.R., Malim, M.H. (1992). Secreted placental alkaline phosphatase as a eukaryotic reporter gene. *Methods Enzymol.* 216, 362-368.
- (37) Dirks, W., Wirth, M., Hauser, H. (1993). Dicistronic transcriptionunits for gene expression in mammalian cells. *Gene* 128, 247-249.
- (38) Doerr, H.W. (1987). Cytomegalovirus infections in pregnancy. *J. Virol. Methods* 17, 127-32.

- (39) Doniger, J., Muralidhar, S., Rosenthal, L.J. (1999). Human cytomegalovirus and human herpesvirus 6 genes that transform and transactivate. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 367 - 382.
- (40) Duboise, S.M., Guo, J., Desroisiers R. C., Jung J.U. (1996). Use of virion DNA as a cloning vector for the construction of mutant and recombinant herpesviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 11389-11394.
- (41) Ebeling, A., Keil, G.M., Knust, E., Koszinowski U.H. (1983). Molecular cloning and physical mapping of murine cytomegalovirus DNA. *J. Virol.* 47, 421-433.
- (42) Ehsani, M.E., Abraha, T.W., Netherland-Snell, C., Mueller, N., Taylor, M.M., Holwerda, B. (2000). Generation of mutant murine cytomegalovirus strains from overlapping cosmid and plasmid clones. *J. Virol.* 74, 8972-8979.
- (43) Emery, V.C., Griffiths, P.D. (1990). Molecular biology of cytomegalovirus. *Int. J. Exp. Path.* 71, 905-918.
- (44) Fink, D.J., Glorioso, J.C. (1997). Engineering herpes simplex virus vectors for gene transfer to neurons. *Nature Med.* 3, 357 - 359.
- (45) Forbes, B.A.. (1989). Acquisition of cytomegalovirus infection: an update. *Clin. Microbiol. Rev.* 2, 204-216.
- (46) de Gast, G.C., Boland, G.J., Vlieger, A.M. et al. (1992). Abortive human cytomegalovirus infection in patients after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 9, 221 - 225

- (47) Gault, E., Michel, Y., Dehee, A., Belabani, C., Nicolas, J.C., Garbarg-Chenon, A. (2001). Quantification of human cytomegalovirus DNA by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 39, 772 – 775.
- (48) Gärtner, B. (2002). in: Doerr, W., Gerlich, W.H. *Medizinische Virologie*. Stuttgart, Thieme Verlag, 370-372.
- (49) Gelderblom, H.R. (2003). Elektronenmikroskopie im Methodenspektrum der Bioterrorismus-Diagnostik. *Bundesgesundheitsbl.* 46, 984 – 988.
- (50) Geuze, H.J. (1999). A future for electron microscopy in cell biology. *Trends Cell Biol.* 9, 92-93.
- (51) Ghazal, P., Messerle, M., Osborn, K., Angulo, A. (2003). An essential role of the enhancer for murine cytomegalovirus in vivo growth and pathogenesis. *J. Virol.* 77, 3217-3228.
- (52) Gibson W., Baxter M.K., Clopper K.S. (1996). Cytomegalovirus "missing" capsid protein identified as heat-aggregable product of human cytomegalovirus UL46. *J. Virol.* 70, 7454-7461.
- (53) Gibson, W. (1983). Protein counterparts of human and simian cytomegaloviruses. *Virology* 128, 391-408.
- (54) Gonczol E., Plotkin S. (2001). Development of a cytomegalovirus vaccine : lessons from recent clinical trials. *Expert Opin. Biol. Ther.* 1: 401-413.
- (55) Gondo, Y., Shioyama, Y., Nakao, K., Katsuki, M.. (1996). A novel positive detection system of in vivo mutations in rpsL (strA) transgenic mice. *Mutat. Res.* 360: 1-14.

- (56) Greaves, R.F., Brown, J.M., Vieira, J., Mocarski, E.S. (1995). Selectable insertion and deletion mutagenesis of the human cytomegalovirus genome using the *Escherichia coli* guanosine phosphoribosyl transferase (gpt) gene. *J. Gen. Virol.* 76, 2151-2160.
- (57) Grefte, A., van der Giessen, M., van Son, W., The, T.H. (1993). Circulating cytomegalovirus infected endothelial cells in patients with an active CMV infection. *J. Infect. Dis.* 167, 270-277.
- (58) Grillot-Courvalin C, Goussard S, Huetz F, Ojcius DM, Courvalin P. (1999). Functional gene transfer from intracellular bacteria to mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 16: 862-866.
- (59) Guiver, M., Fox, A.J., Mutton, K., Mogulkoc, N., Egan, J. (2001). Evaluation of CMV viral load using TaqMan CMV quantitative PCR and comparison with CMV antigenemia in heart and lung transplant recipients. *Transplantation* 71, 1609 - 1615.
- (60) Haas, R., Kahrs, A.F., Facius, D., Allmeier, H., Schmitt, R., Meyer, T.F.. (1993) TnMax – a versatile mini-transposon for the analysis of cloned genes and shuttle mutagenesis. *Gene* 130, 23-31 .
- (61) Hahn, G., Khan, H., Baldanti, F., Koszinowski, U.H., Revello, M.G., Gerna, G. (2002). The human cytomegalovirus ribonucleotide reductase homolog UL45 is dispensable for growth in endothelial cells, as determined by a BAC-cloned clinical isolate of human cytomegalovirus with preserved wild-type characteristics. *J. Virol.* 76, 9551 - 9555.
- (62) Hahn, G., Jores, R., Mocarski, E.S. (1998). Cytomegalovirus remains latent in a common precursor of dendritic and myeloid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 31, 3937 - 3942.

- (63) Hansen, S.G., Strelow, L.I., Franchi, D.C., Anders, D.G., Wong, S.W. (2003). Complete sequence and genomic analysis of rhesus cytomegalovirus. *J. Virol.* 77, 6620-6636.
- (64) Hazelton, P.R., Gelderblom, H.R. (2003). Electron microscopy for rapid diagnosis of infectious agents in emergency situations. *Emerg. Inf. Dis.* 9, 294 - 303
- (65) Hebart, H., Dagnik, S., Stevanovic, S. et al. (2002). Sensitive detection of human cytomegalovirus peptide-specific cytotoxic T-lymphocyte responses by interferon-gamma-enzyme-linked immunospot assay and flow cytometry in healthy individuals and in patients after allogeneic stem cell transplantation. *Blood.* 99, 3830-3837.
- (66) Hensel, G., Meyer, H., Gartner, S., Brand, G., Kern, H.F. (1995). Nuclear localization of the human cytomegalovirus tegument protein pp150 (ppUL32). *J. Gen. Virol.* 76, 1591 - 1601.
- (67) Ho, M. (1991). *Cytomegalovirus. Biology and Infection.* 2nd edition. Plenum Publishing, New York, USA
- (68) Hobom, U., Brune, W., Messerle, M., Hahn, G., Koszinowski U.H. (2000). Fast screening procedures for random transposon libraries of cloned herpesvirus genomes: mutation analysis of human cytomegalovirus envelope glycoprotein genes. *J. Virol.* 74, 7720-7729.
- (69) Hoekstra, M.F., Seifert, H.S., Nickoloff, J., Heffron, F. (1991). Bacterial transposons for genetic manipulations in yeast. *Methods Enzymol.* 194, 329-342.
- (70) Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., Gelfand, D.H.. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 7276-7280.

- (71) Hyun, J.J., Park, H.S., Kim, K.H., Kim, H.J. (1999). Analysis of transcripts expressed from the UL47 gene of human cytomegalovirus. *Arch. Pharm. Res.* 22, 542 - 548.
- (72) Irmiere, A., Gibson, W. (1983). Isolation and characterization of non-infectious virion-like particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus. *Virology* 130, 118-130.
- (73) Jacobson M.A., Stanley H., Holtzer C., Margolis T.P., Cunningham E.T. (2000). Natural history and outcome of new AIDS-related cytomegalovirus retinitis diagnosed in the era of highly active antiretroviral therapy. *Clin. Infect. Dis.* 30: 231-233.
- (74) Junker, M., Galle, P., Schaller, H. (1987). Expression and replication of the hepatitis B virus genome under foreign promoter control. *Nucleic Acids Res.* 15, 10117–10132.
- (75) Jonjic, S., Mutter, W., Weiland, F., Reddehase, M.J., Koszinowski, U.H. (1989). Site-restricted persistent cytomegalovirus infection after selective long-term depletion of CD4⁺ T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 169, 1199-1212.
- (76) Karrer, U., Wagner, M., Sierro, S. et al. (2004). Expansion of protective CD8⁺ T-cell responses driven by recombinant cytomegaloviruses. *J. Virol.* 78, 2255-2264 .
- (77) Kemble, G.W., Mocarski, E.S. (1989). A host cell protein binds to a highly conserved sequence element (pac-2) within the cytomegalovirus a sequence. *J. Virol.* 63, 4715-4728.
- (78) Kitamura, D., Roes, J., Kuhn, R., Rajewsky, K. (1991). A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene. *Nature* 350, 423 –426.

- (79) Knox, K.K., Drobyski, W.R., Carrigan, D.R. (1991) Cytomegalovirus isolate resistant to ganciclovir and foscarnet from a marrow transplant patient. *Lancet*. 337, 1292-1293.
- (80) Koch, R., Schwalbe, J.(Hrsg.). (1912),. *Gesammelte Werke von Robert Koch*, Thieme Verlag, Leipzig.
- (81) Kunke, D., Broucek, J., Kutinova, L. et al. (1993). Vaccinia virus recombinants co-expressing hepatitis B virus surface and core antigens. *Virology* 195, 132-139.
- (82) Lagenaur, L.A., Manning, W.C., Vieira, J., Martens, C.L., Mocarski, E.S. (1994). Structure and function of the murine cytomegalovirus *sgg1* gene: a determinant of viral growth in salivary gland acinar cells. *J. Virol.* 68, 7717 –7727.
- (83) LaPierre, L.A., Biegalka, B.J. (2001). Identification of a novel transcriptional repressor encoded by human cytomegalovirus. *J. Virol.* 75, 6062-6069.
- (84) Lee, C.H., Bhagwat, A., Heffron, F. (1983). Identification of a transposon Tn3 sequence required for transposition immunity. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 80, 6765-6769.
- (85) Lee, J.Y., Irmiere, A., Gibson, W. (1988): Primate cytomegalovirus assembly : evidence that DNA packing occurs subsequent to B capsid assembly. *Virology* 167, 87-96.
- (86) Lembo D., Donalisio M., Hofer A., Cornaglia M., Brune W., Koszinowski U. et al. (2004). The ribonucleotide reductase R1 homolog of murine cytomegalovirus is not a functional enzyme subunit but is required for pathogenesis. *J. Virol.* 78, 4278-4288.

- (87) Lembo, D., Gribaudo, G., Hofer, A. et al. (2000). Expression of an altered ribonucleotide reductase activity associated with the replication of murine cytomegalovirus in quiescent fibroblasts. *J. Virol.* 74, 11557-11565.
- (88) Li, H., Dummer, J.S., Estes, W.R., Meng, S., Wright, P.F., Tang, Y.W. (2003). Measurement of human cytomegalovirus loads by quantitative real-time PCR for monitoring clinical intervention in transplant recipients. *J. Clin. Microbiol.* 41, 187 - 191.
- (89) Limaye, A.P., Huang, M.L., Leisenring, W., Stensland, L., Corey, L., Boeckh, M. (2001). Cytomegalovirus (CMV) DNA load in plasma for the diagnosis of CMV disease before engraftment in hematopoietic stem-cell transplant recipients. *J. Infect. Dis.* 183, 377-382.
- (90) Mandele, C.R. (2003). Diagnosing smallpox in possible bioterrorist attack. *Lancet* 361, 97-98.
- (91) Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY, USA
- (92) Manning, W.C., Mocarski, E.S. (1988). Insertional mutagenesis of the murine cytomegalovirus genome: one prominent alpha gene (ie2) is dispensable for growth. *Virology* 167, 477-484.
- (93) Meijer E., Boland G.J., Verdonck L.F. (2003). Prevention of cytomegalovirus disease in recipients of allogeneic stem cell transplants. *Clin. Microbiol. Rev.* 16: 647-657.
- (94) Meyer, H.H., Ripalti, A., Landini, M.P., Radsak, K., Kern, H.F., Hensel, G.M. (1997). Human cytomegalovirus late-phase maturation is blocked by stably expressed UL32 antisense mRNA in astrocytoma cells. *J. Gen. Virol.* 78, 2621 –2631.

- (95) McDonough, S.H., Spector, D.H. (1983). Transcription in human fibroblasts permissively infected by human cytomegalovirus strain AD169. *Virology* 125, 31-46.
- (96) McGeoch, D.J. (1989). The genomes of the human herpesviruses: Contexts, Relationships, and Evolution. *Annu. Rev. Microb.* 43, 235-265.
- (97) McGavran, M.H., Smith, M.G. (1965). Ultrastructural, cytochemical and microchemical observations on cytomegalovirus infection of human cells in tissue culture. *Exp. Mol. Path.* 4, 1-10.
- (98) McGregor, A., Schleiss, M.R. (2001). Recent advances in herpesvirus genetics using bacterial artificial chromosomes. *Mol. Genet. Metabol.* 72, 8-14.
- (99) Meier, L.J., Stinski, M.F. (1996). Regulation of human cytomegalovirus immediate-early gene expression. *Intervirology* 39, 331-342.
- (100) van der Meer, J.T., Drew, W.L., Bowden, R.A. et al. (1996). Summary of the international consensus symposium on advances in the diagnosis, treatment and prophylaxis of cytomegalovirus. *Antiviral Res.* 32, 119-140.
- (101) Menard, C., Wagner, M., Ruzsics, Z., Holak, K., Brune, W., Campbell, A.E., Koszinowski U.H. (2003). Role of murine cytomegalovirus US22 gene family members in replication in macrophages. *J. Virol.* 77: 5557-5570.
- (102) Mendelson, M., Monard, S., Sissons, P., Sinclair, J. (1996). Detection of endogenous human cytomegalovirus in CD34+ bone marrow progenitors. *J. Gen. Virol.* 77, 3099-102.

- (103) 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. USA* 94, 14759-14763.
- (104) Mocarski, E.S. (1996). Cytomegaloviruses and their replication. In: *Fields Virology* 3rd Edition. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, USA. 2447-2492.
- (105) Mocarski, E.S., Kemble, G.W. (1996). Recombinant cytomegaloviruses for study of replication and pathogenesis. *Intervirology* 39, 320-330.
- (106) Mocarski, E., Roizman, B. (1982). Structure and role of the herpes simplex virus DNA termini in inversion, circularization and generation of virion DNA. *Cell*. 31, 89-97
- (107) Mocarski E.S., Post L.E., Roizman B. (1980). Molecular engineering of the herpes virus genome: insertion of a second L-S junction causes additional genome inversions. *Cell* 22, 243-255.
- (108) Mok, Y.K., Clark, D.R., Kam, K.M., and Shaw, P.C. (1991). BsiY I, a novel thermophilic restriction endonuclease that recognizes 5' CCNNNNNNNGG 3' and the discovery of a wrongly sequenced site in pACYC177. *Nucleic Acids Res.* (1991); 19: 2321-2323.
- (109) Morello, C.S., Cranmer, L.D., Spector, D.H. (2000). Suppression of murine cytomegalovirus (MCMV) replication with a DNA vaccine encoding MCMV M84 (a homolog of human cytomegalovirus pp65). *J. Virol.* 74, 3696 - 3708.
- (110) Morrello, C.S., Cranmer, L.D., Spector, D.H. (1999). In vivo replication, latency, and immunogenicity of murine cytomegalovirus mutants with deletions in the M83 and M84 genes, the putative homologs of human cytomegalovirus pp65 (UL83). *J. Virol.* 73, 7678 –7693.

- (111) Morin, J.E., Lubeck, M.D., Barton, J.E., Conley, A.J., Davis, A.R., Hung, P.P. (1987). Recombinant adenovirus induces antibody response to hepatitis B virus surface antigen in hamsters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 4626-4630.
- (112) Mullberg, J., Hsu, M.L., Rauch, C.T., Gerhart, M.J., Kaykas, A., Cosman, D. (1999). The R27080 glycoprotein is abundantly secreted from human cytomegalovirus-infected fibroblasts. *J. Gen. Virol.* 80, 437-440.
- (113) Muranyi, W., Haas, J., Wagner, M., Krohne, G., Koszinowski, U.H. (2002). Cytomegalovirus recruitment of cellular kinases to dissolve the nuclear lamina. *Science*. 854-857.
- (114) Myers, R.S., Stahl, F.W. (1994). Chi and the RecBC D enzyme of *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* 28, 49-70.
- (115) Nitsche, A., Steuer, N., Schmidt, C.A., Landt, O., Ellerbrok, H., Pauli, G., Siegert, W. (2000). Detection of human cytomegalovirus DNA by real-time quantitative PCR. *J. Clin. Microbiol.* 38, 2734-2737.
- (116) O'Connor, M., Peifer, M., Bender, W. (1989). Construction of large DNA segments in *Escherichia coli*. *Science* 244, 1307-12.
- (117) Patrone, M., Percivalle, E., Secchi, M. et al. (2003). The human cytomegalovirus UL45 gene product is a late, virion-associated protein and influences virus growth at low multiplicities of infection. *J. Gen. Virol.* 84, 3359 - 3370.
- (118) Plotkin, S.A.. (1999) Vaccination against cytomegalovirus, the changeling demon. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 18, 313-315.

- (119) Plummer, G. (1973). Cytomegaloviruses of man and animals. *Progr. Med. Virol.* 15, 92-125.
- (120) Posfai, G., Koob, M.D., Kirkpatrick, H.A., Blattner, F.R. (1997). Versatile insertion plasmids for targeted genome manipulations in bacteria: isolation, deletion, and rescue of the pathogenicity island LEE of the *Escherichia coli* O157:H7 genome. *J. Bacteriol.* 179, 4426-4428.
- (121) Preiksaitis J.K., Sandhu J., Strautman M. (2002). The risk of transfusion-acquired CMV infection in seronegative solid-organ transplant recipients receiving non-WBC-reduced blood components not screened for CMV antibody (1984 to 1996) : experience at a single Canadian center. *Transfusion* 42, 396-402.
- (122) Preston, V.G., Palfreyman, J.W., Dutia, B.M. (1984). Identification of a herpes simplex virus type 1 polypeptide which is a component of the virus-induced ribonucleotide reductase. *J. Gen. Virol.* 65, 1457 - 1466.
- (123) Prober, C.G., Arvin, A.M. (1987). Perinatal viral infections. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 6, 245-261 .
- (124) Pultoo A., Meetoo G., Pyndiah M.N., Khittoo G. (2001). Seroprevalence of cytomegalovirus infection in Mauritian volunteer blood donors. *Indian J. Med. Sci.* 55, 73-78.
- (125) Rawlinson, W.D., Farrell H.E., Barrell B.G. (1996). Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus. *J. Virol.* 70, 8833-8849.
- (126) Razonable, R.R., Paya, C.V., Smith, T.F. (2002). Role of the laboratory in diagnosis and management of cytomegalovirus infection in hematopoietic stem cell and solid-organ transplant recipients. *J. Clin. Microbiol.* 40, 746 - 752.

- (127) Reddehase, M.J., Weiland, F., Munch, K., Jonjic, S., Luske, A., Koszinowski, U.H. (1985). Interstitial murine cytomegalovirus pneumonia after irradiation: characterization of cells that limit viral replication during established infection of the lungs. *J. Virol.* 55, 264-273.
- (128) Remaut, E., Tsao, H., Fiers, W. (1983). Improved plasmid vectors with a thermoinducible expression and temperature-regulated runaway replication. *Gene* 22,103-113.
- (129) Ribbert, H. (1904). Über protozoenartige Zellen in der Niere eines syphilitischen Neugeborenen und in der Parotis von Kindern. *Zentralbl. Allg. Pathol.* 15, 945-948
- (130) Roizman, B. (1981). Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature and taxonomy. *Intervirology.* 16, 201-217.
- (131) Roizman, B. (1979). The structure and isomerization of herpes simplex virus genomes. *Cell.* 16, 481-494.
- (132) Sanchez, V., K. , Greis, D., Sztul, E., Britt, W.J. (2000). Accumulation of virion tegument and envelope proteins in a stable cytoplasmic compartment during human cytomegalovirus replication: characterization of a potential site of virus assembly. *J. Virol.* 74, 975 –986.
- (133) Schacherer, C., Braun, W., Bauer, G., Doerr, H.W. (1988). Detection of cytomegalovirus in bronchial lavage and urine using a monoclonal antibody to an HCMV early nuclear protein. *Infection* 16, 288-292.
- (134) Schaffer, P.A. (1975). Temperature-sensitive mutants of herpesviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 70, 51-100.

- (135) Scholz, M., Cinatl, J. Jr., Doerr, H.W. (1997). Prophylaxis of cytomegalovirus disease in high-risk patients. *Infection* 25, 269-273.
- (136) Shizuya, H., Birren, B., Kim, U.J., Mancino, V., Slepak, T., Tachiiri, Y., Simon, M. (1992). Cloning and stable maintenance of 300-kilo-base-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 8794-8797.
- (137) Sinzger, C., Jahn, G. (1996). Human cytomegalovirus cell tropism and pathogenesis. *Intervirology* 39, 302-312.
- (138) 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. USA.* 15, 8794-8797.
- (139) Spector, D.H. (1996). Activation and regulation of human cytomegalovirus early genes. *Intervirology* 39, 361-377.
- (140) Smith, G.A., Enquist, L.W. (1999). Construction and transposon mutagenesis in *E.coli* of a full-length infectious clone of pseudorabies virus, an alpha herpesvirus. *J. Virol.* 73, 6405-14.
- (141) Smith G.R. (1988). Homologous recombination in procaryotes. *Microbiol. Rev.* 52, 1-28.
- (142) Stenberg, R.M. (1996). The human cytomegalovirus major immediate-early gene. *Intervirology* 39, 333-349.

- (143) Stinski, M.F. (1983). Molecular biology of herpesviruses. In: Roizman, B. (Hrsg.). Herpesviruses. Plenum, New York, USA. 67-113.
- (144) Staprans, S.I., Rabert, D.K., Spector, D.H. (1988). Identification of sequence requirements and trans-acting functions necessary for regulated expression of a human cytomegalovirus early gene. *J. Virol.* 62, 3463-3473.
- (145) Stroh, C., Held, J., Samraj, A.K., Schulze-Osthoff, K. (2003). Specific inhibition of transcription factor NF-kappaB through intracellular protein delivery of I kappaBalpha by the Herpes virus protein VP22. *Oncogene.* 22, 5367 - 5373.
- (146) Sweet, C. (1999). The pathogenicity of cytomegalovirus. *FEMS Microb. Rev* 23, 457-482 .
- (147) Telford, J.L., Kressmann, A., Koski, R.A., Grosschedl, R., Muller, F., Clarkson, S.G., Birnstiel, M.L. (1979). Delimitation of a promoter for RNA polymerase III by means of a functional test. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 2590-2594.
- (148) Tokusumi, T., Iida, A., Hirata, T., Kato, A., Nagai, Y., Hasegawa, M. (2002). Recombinant Sendai virus expressing different levels of a foreign reporter gene. *Virus Res.* 86, 33-38.
- (149) Trus, B. L., Gibson, W., Cheng, N., Steven, A. C. (1999). Capsid structure of simian cytomegalovirus from cryoelectron microscopy: evidence for tegument attachment sites. *J. Virol.* 73, 2181 –2192.
- (150) Vieira, J., Farrell, H.E., Rawlinson, W.D., Mocarski, E.S.. (1994). Genes in the HindIII J fragment of the murine cytomegalovirus genome are dispensable for growth in cultured cells: insertion mutagenesis with a lacZ/gpt cassette. *J. Virol.* 68, 4837-4846.

- (151) Vink, C., Beuken, E., Bruggeman, C. A.. (2000). Complete DNA sequence of the rat cytomegalovirus genome. *J. Virol.* 74, 7656-7665.
- (152) Vogel, J.U., Scholz, M., Cinatl, J. Jr. (1998). Treatment of CMV diseases. *Intervirology* 40, 357-367.
- (153) Wagner, M., Jonjic, S., Koszinowski, U.H., Messerle, M. (1999). Systematic excision of vector sequences from the BAC-cloned herpesvirus genome during virus reconstitution. *J. Virol.* 73, 7056-7060.
- (154) Waldman, W.J., Knight, D.A., Huang, E.H., Sedmak, D.D. (1995). Bidirectional transmission of infectious cytomegalovirus between monocytes and vascular endothelial cells: an in vitro model. *J. Infect. Dis.* 171, 263-272
- (155) Walter, E.A., Greenberg, P.D., Gilbert, M.J., Finch, R.J., Watanabe, K.S., Thomas, E.D., Riddell, S.R. (1995). Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogenic bone marrow by transfer of t-cell clones from the donor. *N. Engl. J. Med.* 333, 1038-1044.
- (156) Wang, S.K., Duh, C.Y., Chang, T.T. (2000). Cloning and identification of regulatory gene UL76 of human cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* 81, 2407-2416.
- (157) Weber, B., Doerr, H.W. (1994). Diagnosis and epidemiology of transfusion-associated human cytomegalovirus infection: recent developments. *Infusionsther. Transfusionsmedizin* 21 (Suppl. 1), 32-39
- (158) Weber, B., Braun, W., Cinatl, J. Jr., Doerr, HW. (1993). Humoral immune response to human cytomegalovirus infection: diagnostic potential of immunoglobulin class and IgG subclass antibody response to human cytomegalovirus early and late antigens. *Clin. Invest.* 71, 270-276.

- (159) Weiland, F., Keil, G.M., Reddehase, M.J., Koszinowski, U.H. (1986). Studies on the morphogenesis of the murine cytomegalovirus. *Intervirology* 26, 192-201.
- (160) Weststrate, M.W., Geelen, J.L., Wertheim, P.M., van der Noordaa, J. (1983). Comparison of the physical maps of the DNAs of two cytomegalovirus strains. *J. Gen. Virol.* 64, 47-55.
- (161) Wiertz, E.J., Jones, T.R., Sun, L., Bogyo, M., Geuze, H.J., Ploegh, H.L. (1996). The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell* 84, 769 –779.
- (162) Wild, J., Hradecna, Z., Szybalski, W. (2002). Conditionally amplifiable BACs: switching from single-copy to high-copy vectors and genomic clones. *Genome Res.* 12, 1434 - 1444.
- (163) Xiao, J., Tong, T., Zhan, X., Haghjoo, E., Liu, F. (2000). In vitro and in vivo characterization of a murine cytomegalovirus with a transposon insertional mutation at open reading frame M43. *J. Virol.* 74, 9488 - 9497.
- (164) Yang, J., Zhou, W., Zhang, Y., Zidon, T., Ritchie, T., Engelhardt, J.F. (1999). Concatamerization of adeno-associated virus circular genomes occurs through intermolecular recombination. *J Virol.* 73, 9468-9477
- (165) Yang, X. W., Model, P., Heintz, N. (1997). Homologous recombination based modification in *Escherichia coli* and germline transmission in transgenic mice of a bacterial artificial chromosome. *Nat Biotechnol.* 15, 859 - 865.
- (166) van Zijl, M., Quint, W., Briaire, J., de Rover, T., Gielkens, A., Berns, A. (1988). Regeneration of herpesviruses from molecularly cloned subgenomic fragments. *J. Virol.* 62, 2191-219

An dieser Stelle möchte ich all denen recht herzlich Danken, die für das Gelingen dieser Arbeit einen Beitrag geleistet haben.

Herrn Prof. Dr. Ulrich H. Koszinowski danke ich für die Überlassung des Themas, den von der ersten Minute an freundlichen Umgang, die hervorragende Betreuung, für das große Interesse, welches er an dieser Arbeit entgegenbrachte, und für die immer ehrliche und direkte Meinung.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Peter H. Hofschneider danke ich für das Feuer, mit dem das Interesse an der Virologie bei mir entzündet hat und das bis noch bis heute brennt.

Herrn Prof. Dr. Georg Bornkamm danke ich für die Kinderschuhe, mit denen ich auf dem glatten Parkett der Molekularbiologie laufen lernte.

Herrn Prof. Dr. Gert Frösner danke ich für die Gelassenheit, mit der er mir seine Laborfläche zur Verfügung stellte und die stoische Ruhe, mit der er diese Zeit der Okkupation erduldet

Frau Dr. Eva Borst und Herrn Dr. Martin Messerle danke ich für das offene Ohr und die Engelsgeduld für all meinen Fragen und Problemen. Martin, ich besitze immer noch eine recht kryptische Zeichnung mit dem Unterschied zwischen COM-O und COM-X !

Frau Claudia Stemmann und Frau Anna Hegele danke ich für das freundliche Arbeitsklima und den exzellenten technischen Support, und insbesondere die vielen Chemikalien und Lösungen, die ich mir borgen durfte –ich bringe sie irgendwann zurück !

Frau Dr. Caroline Herwig danke ich das große Interesse, welches Sie dieser Arbeit entgegenbrachte und für das viele Verständnis.

Frau Dr. Carine Ménard danke ich, dass sie Deutsch gelernt hat, damit ich nicht Französisch lernen musste, und für die vielen wundervollen Gespräche im Labor. Carine, Du bist sicher die charmanteste Person, mit der man zusammenarbeiten kann !

Last but not least und nicht auf der letzten Seite, sondern auf einer eigenen, speziellen, danke ich Dr. Wolfram Brune für die vielen Stunden der Planung, die vielen Tage der Einweisung, die vielen Wochen der Betreuung, die vielen Monate der Begleitung und die vielen Jahre des Wartens.

Diese Arbeit bzw. Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Veröffentlichungen erwähnt

Krych, M., Brune, W., Messerle, M., Jonjic, S., Koszinowski, U.H. (1998). Sezernierbare Marker Gene im MCMV-Genom. Eine Methode zur Messung der Virus-Aktivität in vivo. In: Th. Demant, D. Seidel (Hrsg.). Research Festival '98. MMW Medien & Medizin Verlag, München. 381

Krych, M., Brune, W., Hasan, M., Jonjic, S., Koszinowski, U.H. (2000). Rekombinante sezernierbare Marker-Gene und real-time PCR bei MCMV: Zwei Methoden zur Messung der Virusaktivität. (2000). 21. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie in Wien.

Brune, W., Hasan, M., Krych, M., Bubic, I., Jonjic, S., Koszinowski, U.H. (2001). Secreted virus-encoded proteins reflect murine cytomegalovirus productivity in organs. J. Infect. Dis. 15: 1320-1324.

LEBENS LAUF

Name: Matthäus Krych

Geburtsdatum: 3. Mai 1973

Geburtsort: Posen

Adresse: Appenzeller Str. 95, 81475 München

Eltern: Dr. med. Eva Anna Krych, geb. v. Rozlusky, Fachärztin für
Allgemeinmedizin
Dipl. Ing. Gustav Czeslaw Krych, Ingenieur für Forstwirtschaft und
Gartenbau

Familienstand: ledig

Konfession: römisch –katholisch

Staatsangehörigkeit deutsch

Schulbildung 1984 –1993 Gymnasium Untergriesbach, Niederbayern
1993 Abitur

Hochschulbildung 1994 –2001 Studium der Humanmedizin an der Ludwig –
Maximilians –Universität München
April 2001 3. Staatsexamen in München

Arzt im Praktikum 2001 –2002 Medizinische Klinik und Poliklinik III
Klinikum Großhadern der LMU München
Direktor: Prof. Dr. W. Hiddemann
November 2002 Approbation

Arzt in Weiterbildung
Seit Dezember 2002 Medizinische Klinik und Poliklinik III
Klinikum Großhadern der LMU München
Direktor: Prof. Dr. W. Hiddemann