**Universitätsklinikum Ulm**

Institut für Virologie der Universitätsklinik Ulm

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Mertens

# Identifizierung funktioneller Domänen im C-Terminus von pUL48 für dessen nukleären Export und die Virusmorphogenese des Humanen Zytomegalievirus

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

**Alexandra Maselbas**

Stuttgart

2016

Amtierender Dekan: Dr. rer. nat. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Jun-Prof. J. von Einem

2. Berichterstatter: Prof. S. Kochanek

Tag der Promotion: 19.10.2017

**Diese Arbeit wurde im Rahmen des „Promotionsprogramms für experimentelle Medizin „ der Universität Ulm gefördert**

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis II

**1 Einleitung ..... 1**
1.1 Herpesviridae ..... 1
1.2 Das humane Zytomegalievirus ..... 2
1.3 Antivirale Therapie ..... 5
1.4 Aufbau des HCMV-Partikels ..... 7
1.5 Das virale Genom und der Replikationszyklus von HCMV ..... 9
1.6 Die Tegumentproteine von HCMV ..... 14
1.7 Das Tegumentprotein pUL48 ..... 16
1.8 Transport zwischen Zellkern und Zytoplasma ..... 17
1.9 Nukleärer Export und die NES von Proteinen ..... 19
1.10 Ziele der Arbeit ..... 21

**2 Material und Methoden ..... 22**
2.1 Material ..... 22
2.2 Methoden ..... 40

**3 Ergebnisse ..... 63**
3.1 Vorstellung der verwendeten Viren ..... 63
3.2 Rekonstitution der Mutanten ..... 64
3.3 Generierung der TBUL48-DelC80 Revertante ..... 65
3.4 Charakterisierung der HCMV-48-5LtoA Virusmutante ..... 69
3.5 Generierung einer neuen Virusmutante: die TBUL48-DelC28 Mutante ... 92
3.6 Charakterisierung der TBUL48-DelC28 Mutante ..... 93
3.7 pUL48- Ausbreitung ohne Infektion ? ..... 102

**4 Diskussion ..... 108**
4.1 Identifizierung des nukleären Exportsignals ..... 108
4.2 Die Bedeutung des C-Terminus für die Virusmorphogenese ..... 111
4.3 Selektive Ausbreitung von pUL48 über *Dense bodies* ..... 114

**5 Zusammenfassung ..... 115**

**6. Literaturverzeichnis ..... 116**

**Lebenslauf ..... 132**

# Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| 2xYT | 2x yeast/tryptone |
| A | Ampere |
| AEC | 3-amino-9-ethylcarbazol |
| AIDS | Acquired Immune Deficiency Syndrome |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| BAC | Bacterial artificial chromosome |
| BFA | Brefeldin A |
| BSA | Bovines Serum Albumin |
| bzw. | Beziehungsweise |
| c.a. | Circa |
| Carb | Carbenicillin |
| Chl | Chloramphenicol |
| CRM-1 | Chromosome region maintenance protein 1 |
| DAPI | 4´,6´-diamino-2-phenylindol |
| DB | Dense Bodies |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dpi | Days post infection |
| E | Early |
| E.coli | Escherichia coli |
| EBV | Ebstein-Barr-Virus |
| EDTA | Ethylendiaminetetraacetic acid |
| EGFR | Epidermal growth factor receptor |
| EM | Elektronenmikroskopie |
| ER | Endoplasmatisches Reticulum |
| FCS | Fetal calf serum |
| Gb | Glykoprotein B |
| gH | Glykoprotein H |
| gM | Glykoprotein M |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| h | Stunde |
| HCMV | Humanes Cytomegalievirus |

| | |
|---|---|
| HFF | Humane Vorhautfibroblasten |
| HHV | Humanes Herpesvirus |
| HMWP | High molecular weight protein |
| HSV | Herpes-simplex-Virus |
| IE | Immediate early |
| IF | Immunfloureszenz |
| IRS | Internal repeat sequences |
| Kan | Kanamycin |
| kb | Kilo Basenpaare |
| Kbp | Kilobasenpaare |
| kDa | Kilodalton |
| KSHV | Kaposi-Sarkoma-Herpesvirus |
| kV | Kilovolt |
| L | Late |
| LB | Luria Bertani |
| LMB | Leptomycin B |
| M | Mol |
| mCP | Minor Capsid Protein |
| MCP | Major Capsid Protein |
| mCP-BP | Minor Capsid Protein –Binding Protein |
| MEM | Minimum essential medium |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| mock | Nicht infizierte Zellen |
| MOI | Multiplicity of infection |
| µF | Mikrofarad |
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |
| NES | Nuclear export signal |
| NIEPS | Noninfectious Enveloped Particles |
| NLS | Nuclear localisation signal |
| Nm | Nanometer |
| NPC | Nuclear pore complex |

| | |
|---|---|
| OD | Optische Dichte |
| ORF | Open reading frame |
| PAGE | Polyacrylamid Gelelektrophorese |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| PFA | Paraformaldehyd |
| pfu | Plaque forming unit |
| PKI | Protein Kinase A-Inhibitor |
| pp | Phosphoprotein |
| PrV | Pseudorabiesvirus |
| PVDF | Polyvinyliden Difluorid |
| RIPA | Radioimmunoprecipitation assay Puffer |
| RNA | Ribonucleic acid |
| RNA | Ribonuclear acid |
| rpm | Rounds per minute |
| RT | Raumtemperatur |
| s | Sekunden |
| SCP | Smallest Capsid Protein |
| SDS | Sodium dodecyl Sulfat |
| SOB | Super optimal broth |
| SOC | Super optimal broth mit Catabolit-Repression |
| TCA | Trichlorsäure |
| TEMED | Tetramethylethylenediamin |
| Tris | Tris(hydroxymerhyl)aminomethan |
| TRS | Terminal repeat sequences |
| UL | Unique long |
| US | Unique short |
| v.a. | Vor allem |
| vAC | Viral assembly complex |
| VZV | Varizella-Zoster-Virus |
| WB | Westernblot |
| WT | Wildtyp |

| | |
|---|---|
| z.B. | Zum Beispiel |
| ZK | Zellkultur |

# 1 Einleitung

## 1.1 Herpesviridae

Die Familie der *Herpesviridae* umfasst über 200 bisher bekannte Virusvertreter, die sowohl in Wirbeltieren und Wirbellosen als auch im Menschen zu finden sind. Die *Herpesviridae* werden unterteilt in drei Subfamilien. Die Einteilung der Virusvertreter in diese Subfamilien erfolgt nach verschiedenen Kriterien wie zum Beispiel ihrem Replikationszyklus oder dem Wirtsspektrum. Vertreter der *Alphaherpesvirinae* Subfamilie sind gekennzeichnet durch einen kurzen Replikationszyklus und ein breites Wirtsspektrum. Viren der *Betaherpesvirinae* haben einen vergleichsweise längeren Replikationszyklus und ein stark eingeschränktes Wirtsspektrum, während die *Gammaherpesvirinae* sich durch ein stark begrenztes Wirtsspektrum und diverse, uneinheitlich lange Replikationszyklen auszeichnen [105, 106, 135]. Insgesamt sind derzeit acht humane Herpesviren bekannt, von welchen die humanen Herpes-simplex-Viren 1 und 2 (HHV 1 und HHV 2 oder auch HSV-1 und HSV-2) sowie das Varicella-Zoster-Virus (HHV 3 oder VZV) zu den *Alphaherpesvirinae* gezählt werden. Die *Betaherpesvirinae* umfassen sowohl das humane Zytomegalievirus (HHV 5 oder HCMV), das Virus dieser Arbeit, als auch die humanen Herpesviren 6 und 7 (HHV 6a, HHV 6b und HHV 7), die ebenfalls als sog. Roseoloviren bekannt sind. Zur Subfamilie der *Gammaherpesvirinae* gehören das Ebstein-Barr-Virus (HHV 4 oder EBV) und das Kaposi-Sarkoma-Herpesvirus (HHV 8 oder KSHV).

Allen Vertretern der Familie der *Herpesviridae* sind ein lineares, doppelsträngiges DNA- Genom, eine spezifische Viruspartikelmorphologie und die Fähigkeit zur Etablierung einer lebenslangen Persistenz im Wirtsorganismus gemein [101]. Die Persistenz bezeichnet die Eigenschaft eines Virus im Wirt latent zu überdauern. Aus dieser Latenz kann das Virus durch exogene oder endogene Einflüsse reaktiviert werden. Diese Fähigkeit zur Reaktivierung, z.B. in immunkomprimierten Patienten, und die weltweite Verbreitung sind von großer Bedeutung für die klinische Relevanz dieser Virusfamilie.

## 1.2 Das humane Zytomegalievirus

HCMV ist das Virus mit dem größten Virionendurchmesser innerhalb der *Herpesviridae*, wobei es sich morphologisch allerdings nicht von den anderen Vertretern der Virusfamilie unterscheidet [146]. Etymologisch bezieht sich der Name des Virus auf die spezifischen zythopathogenen Veränderungen humaner Zellen nach Virusinfektion: Größenzunahme (Zytomegalie), Abkugelung und Entstehung typischer Einschlusskörperchen (Eulenaugenzellen).

HCMV ist ein ubiquitär verbreitetes Virus mit einer hohen Durchseuchungsrate, die in Abhängigkeit von sozioökonomischen Faktoren variiert. In Industriestaaten liegt eine Durchseuchungsrate von durchschnittlich 40-70 % vor [85]. Dabei wird mit Eintritt der Pubertät und Beginn sexueller Kontakte ein steiler Anstieg der Durchseuchungsrate verzeichnet [72]. In Entwicklungsländern wird auf Grund hygienischer Verhältnisse sogar von einer Durchseuchungsrate bis zu 100% ausgegangen [22, 84].

Die Transmission von HCMV erfolgt direkt von Mensch zu Mensch, sowohl horizontal als auch vertikal. Dabei ist eine Übertragung durch direkten Kontakt mit Virus haltigen Körperflüssigkeiten wie Blut, Urin, Speichel, Sperma, Vaginalsekret oder Muttermilch möglich [98, 124]. Allerdings kann die Übertragung auch intrauterin oder konnatal erfolgen, sowie über Blutprodukte oder transplantierte Gewebe.

Bei der Infektion wird unterschieden zwischen der Primärinfektion, als welche die Infektion eines zuvor nicht infizierten Organismus bezeichnet wird, und der Reaktivierung einer latenten Infektion. Ebenfalls möglich ist eine Sekundärinfektion mit einem weiteren HCMV-Stamm zu einer bereits bestehenden HCMV-Infektion.

Klinisch betrachtet verläuft die Mehrzahl der Primärinfektionen beim immunkompetenten Menschen asymptomatisch. Gelegentlich ist eine Primärinfektionen von einer milden Mononukleose-ähnlichen Symptomatik begleitet. Dabei auftretende Symptome können bis zu mehrere Wochen anhaltendes Fieber, Kopfschmerzen, Müdigkeit, Ekzeme, Gelenk- und Muskelschmerzen, Hepatosplenomegalie und Lymphadenopathien sein [54, 98, 125]. Neuerdings beschriebene, aber wohl selten auftretende Symptome mit

gegebener Assoziation zu einer HCMV-Primärinfektion können außerdem arterielle Hypertonie [26] und Thromboembolisation sein [103]. Des Weiteren gibt es Hinweise auf bestehende immunologische Zusammenhänge zwischen einer erfolgten HCMV-Infektion und verschiedenen Autoimmunerkrankungen wie z.B. Lupus erythematodes oder dem Guillan-Barré-Syndrom [24, 99, 100]. Besondere Relevanz kommt der HCMV-Infektion während der Schwangerschaft zu. Problematisch sind vor allem die Primärinfektion einer seronegativen Schwangeren oder die Sekundärinfektion der bereits seropositiven Schwangeren mit einem weiteren virulenten Virusstamm. Dabei ist HCMV mit einem Inzident von 0,3-1,2% die häufigste kongenitale Virusinfektion [61]. Die transplazentare Übertragungswahrscheinlichkeit insgesamt wird bei Primärinfektion mit ca. 40 % angegeben und soll bei Sekundärinfektionen deutlich geringer sein [57, 78, 102, 130]. Besonders hoch ist die Wahrscheinlichkeit einer *in utero* Transmission bei einer maternalen HCMV-Primärinfektion im zweiten und dritten Schwangerschaftstrimenon, wobei die Wahrscheinlichkeit dann ca. bei 40-50% liegt und mit Fortschreiten der Schwangerschaft zunimmt [119]. Im Falle einer Primärinfektion kann es in Abhängigkeit vom Schwangerschaftszeitpunkt zu schwerwiegenden Folgen für das ungeborene Kind kommen, beispielsweise zu Embryopathien oder im schlimmsten Fall zu intrauterinem Fruchttod. Bei einer Primärinfektion innerhalb des ersten Trimenon sind Risiko und Erkrankungsfolgen des Ungeborenen besonders schwerwiegend [92]. In solchen Fällen kann es bei Feten zu unterschiedlichen Symptomen kommen. Diese reichen von der fetalen thrombotischen Vaskulopathie bis hin zum Abort oder dem intrauterinen Fruchttod. Je später die Infektion des Fötus stattfindet, desto milder sind meist die entstehenden Krankheitsfolgen. Neben der intrauterinen Übertragung kann es auch während der Geburt direkt und postnatal, durch HCMV-haltige Muttermilch, zur Virusübertragung kommen [62, 70, 88]. Wird das infizierte Kind schließlich geboren, verläuft die kongenitale HCMV-Infektion, wie beim Erwachsenen, in über 90% asymptomatisch [52]. Bei symptomatischen Kindern sind die häufigsten beobachteten Symptome des Neugeborenen retardiertes Wachstum, Organfehlbildungen wie die Hepatosplenomegalie, Schädigungen des Gehör-/ und Sehsinns bis zum irreversiblen Verlust, Petechien, Ikterus und schwerwiegende Fehlbildungen des zentralen Nervensystems wie beispielsweise die Mikrozephalie [150]. Sind die infizierten Kinder bei Geburt asymptomatisch, ist trotzdem besondere

Vorsicht bei den Nachuntersuchungen geboten, denn auch Jahre nach der Geburt können beim Kind (in bis zu 17%) noch Langzeitfolgen auftreten [38, 50, 52]. Zu diesen Spätfolgen gehören insbesondere Minderung der Hörfähigkeit aber auch Störungen der Sehfähigkeit, mentale Retardierung und Bewegungsstörungen [51, 73]. Von diesen Symptomen sind besonders häufig Frühgeborene betroffen. Bis zu 65% der symptomatisch infizierten und 23% der asymptomatischen infizierten Kinder entwickeln eine Hörstörung [50]. Somit ist dies die häufigste Langzeitfolge der kongenitalen HCMV-Infektion und die Hauptursache für Taubheit bei Kindern [49].

Durch die Fähigkeit von HCMV zur lebenslangen, latenten Persistenz im Wirtsorganismus kann es unter verschiedenen Bedingungen wie z.B. einer Schwächung des Immunsystems zu einer Reaktivierung kommen. Bei immunkompromittierten Patienten können sowohl die Primärinfektion als auch die Reaktivierung zu schwersten und sogar vital bedrohlichen Erkrankungen führen. Besonders häufig treten schwerwiegende Folgeerkrankungen durch HCMV nach Organ- bzw. Knochenmarkstransplantationen auf. Hier manifestiert sich die Infektion besonders mit Fieber und Blutbildveränderungen, Retinitis, Hepatitis, Pneumonie, Ösophagusulzerationen, Polyneuritis, gastrointestinale Beschwerden sowie in der gefürchteten, lebensbedrohlichen Abstoßungsreaktion des Transplantats [19, 77, 84, 131]. Insbesondere sind dabei seronegative Empfänger mit seropositivem Transplantatdonor gefährdet [108, 111].

Ein weiteres gefährdetes Patientenkollektiv bilden die AIDS- Patienten [27]. Hier ist die interstitielle Pneumonie durch HCMV die häufigste Todesursache und Retinitis das am häufigsten auftretende Erkrankungsbild, welches bis 1995 an über 90% der HIV-assoziierten Erblindungen beteiligt war [53]. Auf Grund dieser massiven, lebensbedrohlichen Folgeerkrankungen ist bei immundefizienten oder immunkompromittierten Patienten oft eine antivirale Therapie, sogar über längere Zeiträume hin, indiziert. Diese vermag aber oftmals nur mögliche Symptome der HCMV Infektion zu mildern [98].

## 1.3 Antivirale Therapie

Bisher sind die vier Substanzen Ganciclovir, Valgancilovir, Cidofovir und Foscarnet zur antiviralen Therapie zugelassen (siehe Abbildung 1) [6, 80]. Bei den erstgenannten drei Chemotherapeutika handelt es sich um typische Nukleosidanaloga, bei Foscarnet hingegen um ein Pyrophosphatanalogon. Allerdings liegt allen vier ein ähnlicher Wirkmechanismus zu Grunde, der auf einer Inhibition der viralen DNA-Polymerase pUL54 des HCMV beruht [6, 36]. Zum Erreichen therapeutisch wirksamer Konzentrationen müssen aber alle oben genannten Medikamente, ausgenommen Valganciclovir, intravenös verabreicht werden, was meist eine stationäre Aufnahme des Patienten erfordert.

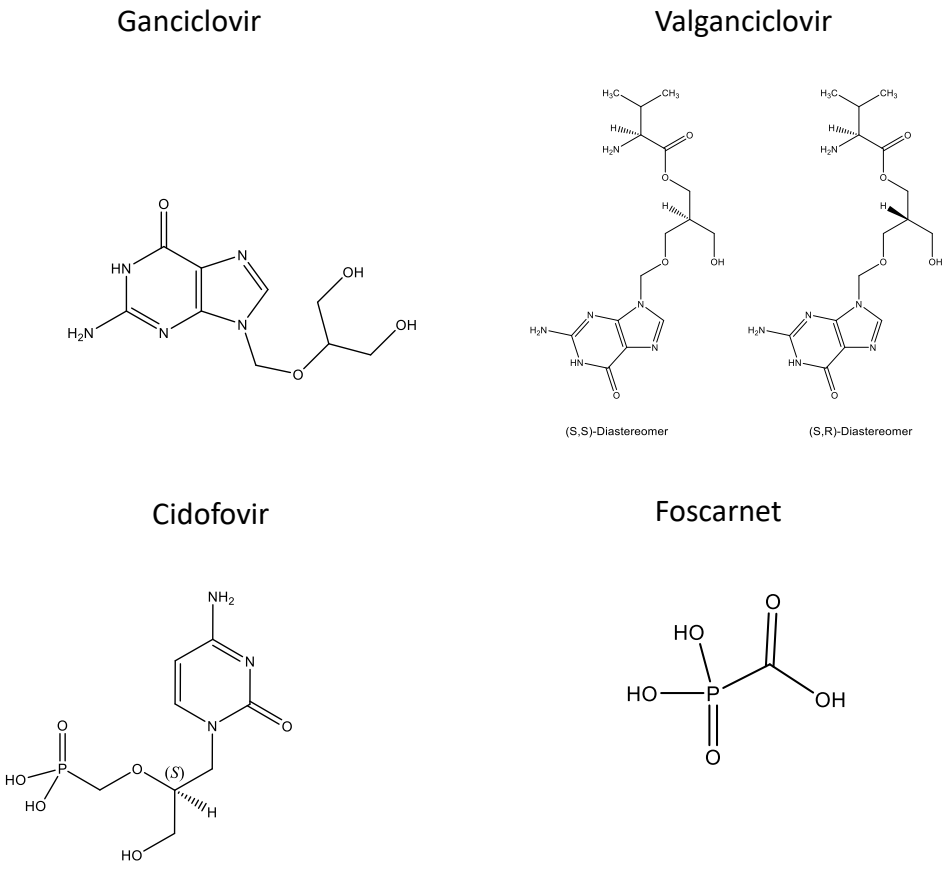



**Abbildung 1 Chemische Struktur der Medikamente gegen eine Infektion mit dem Humanen Zytomegalie Virus (HCMV)**

Die Abbildung zeigt die chemische Struktur der vier aktuell medikamentös genutzten Substanzen zur Behandlung einer HCMV-Infektion: Ganciclovir, Valganciclovir, Cidofovir und Foscarnet. Deutlich erkennbar ist die strukturelle Verwandtschaft von Ganciclovir und Valganciclovir.

Aktuell wird Ganciclovir am häufigsten zur HCMV-Therapie eingesetzt, da die gewünschte antivirale Wirkung im besten Verhältnis zu den unerwünschten Arzneimittelwirkungen steht. Ganciclovir muss durch eine virale Proteinkinase, pUL97, erst phosphoryliert werden, bevor es als synthetisches Nukleosidanalogon die Polymerisation der viralen DNA unterbinden kann [36, 46]. Die Nebenwirkungen dieser Substanz reichen bis hin zu Myelotoxizität und gefährlichen Blutbildveränderungen wie z.B. Leukopenie und Thrombopenie, sowie zu Fällen von Reproduktionstoxizität [11]. Valganciclovir, als veränderte Form des Ganciclovir, ist ein Medikament mit guter oraler Bioverfügbarkeit und besitzt durch die strukturelle Ähnlichkeit dieselben Nebenwirkungen.

Cidofovir ist ein Cytidin-Nukleotid-Analogon und benötigt im Gegensatz zu Ganciclovir keine Modifikation durch virale Komponenten, um seine Wirkung zu entfalten und durch Kettenabbruch die virale DNA-Synthese zu verhindern [11]. Auch dieses Medikament führt allerdings zu unerwünschten Wirkungen, besonders gefährlich sind die dosisabhängige Nephrotoxizität und Neutropenie.[11, 104].

Im Falle von Foscarnet handelt es sich um ein Pyrophosphatanalogon, welches durch die strukturelle Ähnlichkeit mit dem natürlichen Pyrophosphat um die Pyrophosphatbindestelle der viralen DNA-Polymerase konkurriert [6, 29]. Die Folge ist ebenfalls ein Kettenabbruch während der DNA Synthese. Ebenso wie bei den Nukleotidanaloga treten unter der antiviralen Therapie mit Foscarnet Nebenwirkungen auf, welche den therapeutischen Einsatz erschweren. Hierbei handelt es sich um toxische Wirkungen auf die Niere und bedeutende Elektrolytverschiebungen. Auf Grund der erheblichen Schwere der unerwünschten Arzneimittelwirkungen aller zugelassenen Substanzen erweist sich der klinische Einsatz oft als problematisch und bedenklich und muss in jedem Fall genauestens individuell evaluiert werden. Die Nebenwirkungen der verschiedenen Wirkstoffe sind vor allem ein Problem der Langzeittherapie. Bei immungeschwächten Patienten sowie bei Patienten nach Organtransplantation ist der Einsatz des Virostatikums meist über mehrere Wochen indiziert. Dabei kann es zur Selektion resistenter Virenstämme und so zur Ausbildung von Resistenzen gegen das verabreichte Medikament kommen. Hinzu kommt noch der gemeinsame Ansatzpunkt der zur Verfügung stehenden antiviralen Substanzen, wodurch die Möglichkeit einer Kombinationstherapie entfällt.

Als alternativer Ansatz kann in der Schwangerschaft und in Einzelfällen die intravenöse Gabe spezifischer Immunglobuline in Betracht gezogen werden [89]. Trotz intensiver Bemühungen und diverser Forschungsansätze steht bisher kein Impfstoff zur Prophylaxe einer HCMV Infektion zur Verfügung. Folglich ist es von enormer medizinischer Relevanz neue Ansatzpunkte im Infektions- und Replikationsvorgang des HCMV zu finden, um zukünftig weitere therapeutische Optionen zu entwickeln.

## 1.4 Aufbau des HCMV-Partikels

Die viralen Partikel des HCMV, auch Virionen genannt, gehören zu den größten der bekannten humanpathogenen Viren mit einem Durchmesser von ca. 200-300nm [37]. Sie besitzen einen ähnlichen allgemeinen Aufbau wie die Virionen anderer Herpesviren. Vereinfacht besteht ein HCMV-Virion aus vier morphologisch unterscheidbaren Strukturen (siehe auch Abbildung 2): dem viralen Genom, dem umgebenden Kapsid, dem Tegument und der Hüllmembran [85]. Analytisch betrachtet besteht ein Virion aus ca. 50% Tegumentproteinen, 30% Kapsidproteinen, 13% Hüllproteinen und 7% diverser unbekannter Proteine [141]. Im Zentrum des Partikels befindet sich das sogenannte Nukleokapsid, welches aus der viralen DNA und dem umgebenden ikosaedrischen Kapsid besteht. Das HCMV Genom ist ca. 230kbp lang, doppelsträngig und linear. Das Kapsid hat einen Durchmesser von ca. 100-110nm. Es besteht aus vier viralen Hauptproteinen: dem *Major Capsid Protein* (MCP), dem *Minor Capsid Protein* (mCP), dem *mCP- binding Protein* (mCP-BP) und dem *Smallest Capsid Protein* (SCP) [5]. Die Kapsidproteine bilden Proteinuntereinheiten, welche als Kapsomere bezeichnet werden. HCMV Kapside werden durch 162 Kapsomere gebildet, die ihnen die typische ikosaedrische Form verleihen. Zwischen dem Kapsid und der Hüllmembran des Virions liegt das Tegument [83]. Das Tegument ist eine diffuse, scheinbar unstrukturierte Schicht, welche aus über 59 viralen Proteinen und weiteren zellulären Proteinkomponenten besteht [85]. Den Proteinen dieser Schicht, den sogenannten Tegumentproteinen, werden Funktionen als Strukturkomponenten, Initiatoren der Virusreplikation und viele weitere Funktionen zugesprochen [67]. Abgeschlossen werden die Virionen durch eine Hüllmembran aus einer zellulären Phospholipiddoppelschicht mit integrierten viralen Glykoproteinkomplexen [107].

Letztere sind ein wichtiger funktioneller Bestandteil des Virions beim Eintritt des Virus in die Zelle und sind bei der direkten Zell-zu-Zell-Ausbreitung beteiligt [84].

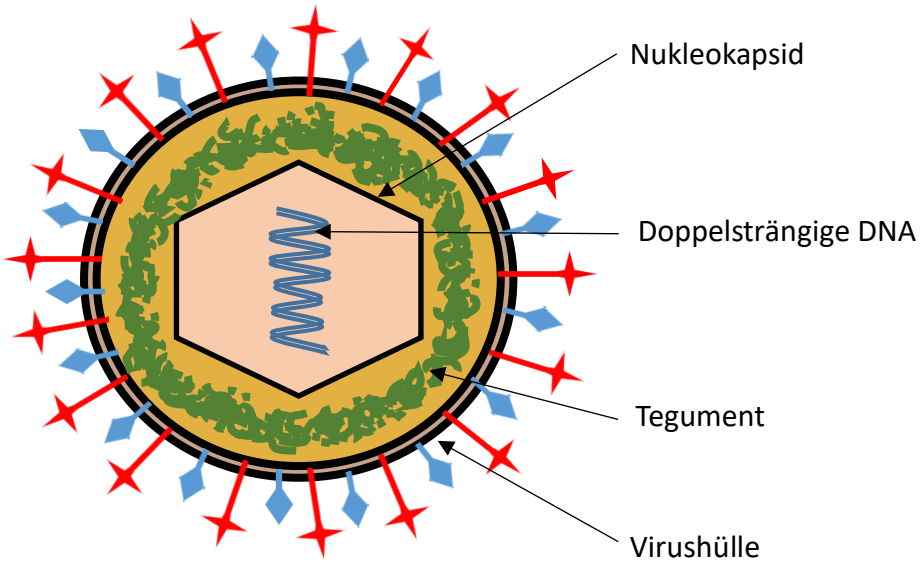



**Abbildung 2 Aufbau eines Virions des Humanen Zytomegalie Virus (HCMV)**

Diese Grafik zeigt den schematischen Aufbau eines HCMV-Partikels. Die Pfeile deuten auf die vier morphologisch unterscheidbaren Strukturen: Die doppelsträngige DNA (blau), das Nucleokapsid (rosa), das Tegument (grün) und die Hüllmembran (schwarz) mit eingelagerten Glykoproteinen (rot und hellblau).

Infizierte Zellen bilden drei verschiedenen Arten von Viruspartikeln. Die „reifen“, infektiösen Virionen mit dem klassischen, oben beschriebenen Aufbau (siehe Abbildung 2), die nichtinfektiösen, umhüllten Partikel (NIEPS) und die sogenannten Dense Bodies (DB). NIEPS besitzen den gleichen strukturellen Aufbau wie die infektiösen Virionen, allerdings fehlt es ihnen an viraler DNA [85]. Dense Bodies sind nicht replizierende, nicht infektiöse, umhüllte Partikel, die v.a. aus dem HCMV Protein pp65 bestehen und einzigartig für die HCMV-Infektion sind [117]

## 1.5 Das virale Genom und der Replikationszyklus von HCMV

### 1.5.1 Das virale Genom

Mit dem größten Genom innerhalb der humanen Herpesviren kodiert HCMV für eine Vielzahl, innerhalb der *Herpesviridae*, konservierter Proteine, sowie einige HCMV spezifische Proteine [17]. Aufgrund seiner Größe und dem ihm zur Verfügung stehenden Volumen im Kapsid ist das HCMV-Genom besonders dicht gepackt [10]. Das doppelsträngige, lineare DNA Genom von 230kbp hat eine Kodierungskapazität für über 220 Open reading frames (ORFs) und mindestens 145 Gene [84]. Das Genom besteht aus zwei sich nicht wiederholenden Sequenzabschnitten, der *unique long* (UL) und der *unique short* (US) Region (Abbildung 3). Dazu kommen sich wiederholende Abschnitte, *die internal repeat sequences* (IRS) und die *terminal repeat sequenes* (TRS) [67]. Die einmaligen Sequenzen werden terminal flankiert von den TRS und intern voneinander abgegrenzt durch eine IRS [13].




**Abbildung 3: Das Genom des Humanen Zytomegalie Virus (HCMV)**

Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung des HCMV-Genoms. Die singulär vorkommenden Abschnitte UL (unique long) und US (unique short) sind hier schwarz. Sie werden von den repetitiven Sequenzen flankiert. Diese werden je nach Position als TRS (terminal repeat sequences), hier in orange und IRS (internal repeat sequences), hier in grün dargestellt, flankiert.

Die Namensgebung der Gene beruht auf folgendem System: vorangestellt wird ein Präfix für den Bereich des Genoms, in welchem das Gen lokalisiert ist. Weiter wird jedem Gen eine sequentielle Nummer bezüglich des Leserahmens in 5´- 3´ Richtung zugeteilt. Dies erlaubt eine sehr genaue Kennzeichnung der einzelnen Gene. UL48, das Gen, welches für das Protein pUL48 kodiert, liegt demnach im Bereich der *unique long* Region und ist das 48. Gen vom 5´ Ende aus gezählt.

Den viralen Genprodukten wird jeweils ein „p“ vorangestellt z.B. pUL48. Alternativ werden phosphorylierte Proteine meist mit „pp“, für Phosphoprotein, und ihrem Molekulargewicht bezeichnet, wie beispielsweise pp150.

### 1.5.2 Der HCMV- Replikationszyklus

HCMV weist einen sehr engen Wirtstropismus auf, was erklärt, warum die Replikation fast ausschließlich auf humane Zellen beschränkt ist. Allerdings kann HCMV verschiedene humane Zellarten produktiv infizieren. Diese sind vor allem Epithelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten, glatte Muskelzellen, Neuronen, Mikroglia und Zellen des hämatopoetischen Systems wie Monozyten und Makrophagen [84, 109].

Allgemein kann der HCMV-Replikationszyklus in mehrere aufeinanderfolgende Abschnitte unterteilt werden, die in der Abbildung 4 schematisch dargestellt sind.

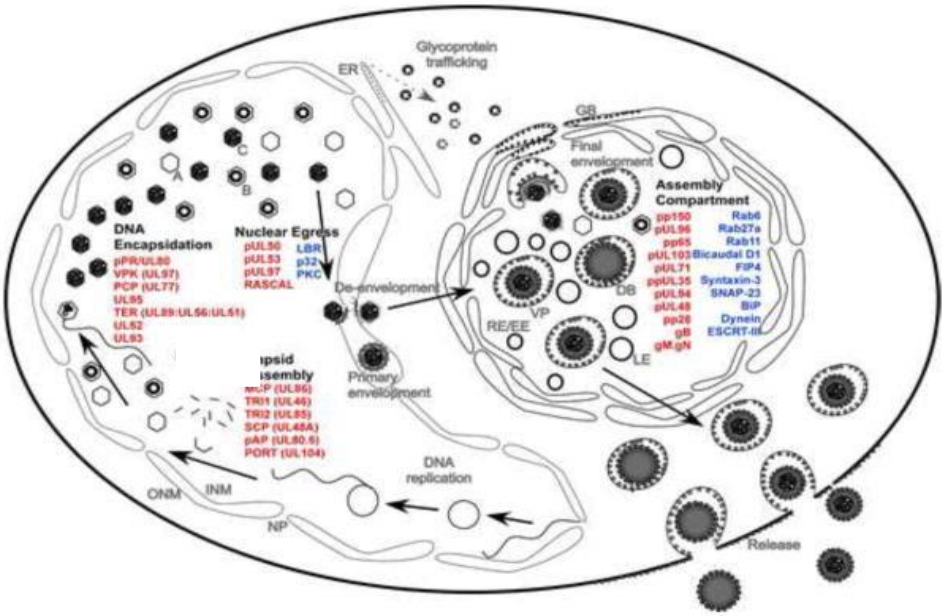



**Abbildung 4 Schematische Darstellung des Replikationszyklus des Humanen Zytomegalie Virus (HCMV)**

Reprinted from Tandon R, Mocarski ES. Viral and host control of cytomegalovirus maturation. Trends in microbiology. 2012;20(8):392-401. doi:10.1016/j.tim.2012.04.008. with permission from Elsevier [135], Die Abbildung zeigt die wichtigsten Stadien des HCMV-Replikationszyklus ab der Genomreplikation. Adsorption und Transport der DNA zum Zellkern sind nicht dargestellt.

Die Infektion einer Wirtszelle beginnt mit der sogenannten Adsorption, dieser Vorgang beschreibt das Andocken der extrazellulären Virionen an die Zielzelle, durch eine Interaktion der viralen Glykoproteine der Virionhüllmembran mit den zellulären Rezeptoren der Wirtszellmembran [81]. Die viralen Proteine, z.B. die glykosylierten Membranproteine *Glykoprotein B* (gB), *Glykoprotein H* (gH) und *Glykoprotein M* (gM), werden dafür in Betracht gezogen. Als zelluläres

Oberflächenmolekül fungiert mit hoher Wahrscheinlichkeit das Heparansulfat zur Herstellung des Erstkontakts von Virion und Wirtszelle [15]. Des Weiteren spielen sekundäre Rezeptoren, wie beispielsweise Integrine und der epidermale Wachstumsfaktor (EGFR), hier noch eine Rolle, wobei genauere Mechanismen noch weitgehend unbekannt sind [65, 143]. Die Bindung der viralen Glykoproteine an zelluläre Rezeptoren initiiert den darauf folgenden Eintritt des Viruspartikels in die Wirtszelle, die sogenannte Penetration. Dieser zellspezifische Prozess kann auf zwei bisher bekannte Arten erfolgen. In Fibroblasten erfolgt die Penetration hauptsächlich durch eine pH- unabhängige Fusion der Virus- und der Wirtszellmembran. Hierbei kommt es zu einer Freisetzung des Nukleokapsids sowie der Tegumentproteine in das Zytoplasma der Wirtszelle. In Epithel- und Endothelzellen wird das Virion vorwiegend durch Endozytose in die Zelle aufgenommen [12, 122]. Anschließend fusionieren im Zytoplasma die virale Hüllmembran und die Vesikelmembran, so dass es nun ebenfalls zur Freisetzung des Nukleokapsids und der Tegumentproteine kommt [110]. In beiden Fällen sorgen die freigesetzten Tegumentproteine für vorteilhafte Bedingungen für die Virusreplikation.

Das Nukleokapsid wird entlang des Mikrotubuli-Netztwerks zu den Kernporen transportiert [91, 127]. Dort wird die virale DNA aus dem Nukleokapsid in den Zellkern freigesetzt. Dieser Vorgang wird als „uncoating“ bezeichnet und ist eine essentielle Voraussetzung für die virale Genexpression im Zellkern.

Nach dem Eintritt in den Zellkern wird die virale DNA zuerst durch Fusion der beiden Enden zirkularisiert [71]. Im Falle einer produktiven Replikation der viralen DNA kommt es zu der, für die Familie der Herpesviren typischen, kaskadenartigen Genexpression. Dabei lassen sich die Gene aufgrund ihrer zeitlichen Expression in drei große Gruppen einteilen: die *„immediate-early“-Gene* (IE-Gene), die *„early“ Gene* (E-Gene) und die *„late“-Gene* (L-Gene). Bereits 20 bis 30 Minuten nach dem Eintritt der viralen DNA in den Kern lassen sich die Produkte der „*immediate-early“-Gene* (IE-Gene) nachweisen [58, 79]. Die Expression der IE-Gene ist im Gegensatz zu den anderen Genen nicht von der Bildung oder Anwesenheit weiterer viraler Proteine abhängig, wobei eine Transaktivierung der IE-Gene durch eingebrachte Tegumentproteine die virale Genexpression begünstigt. Bei den IE-Genprodukten handelt es sich vor allem um die zwei Hauptkomponenten IE-1 und IE-2. Sie sind

im Allgemeinen verantwortlich für die Regulation und Aktivierung der *„early"-Gen* (E-Gen) Transkription [133]. Es folgt die Expression der *„early"-Gene* nach etwa 6 Stunden. Hierbei kommt es vor allem zur Transkription der Gene, die für die Replikation des viralen Genoms und die Aktivierung der *„late"-Gene* (L-Gene) bedeutend sind. Unter den E-Genen sind auch Enzyme der viralen Replikationsmaschinerie, die als Angriffspunkte antiviraler Therapie dienen [145]. 24 Stunden nach Infektion der Zelle beginnt die Expression der *„late"-Gene* (L-Gene). Diese kodieren vor allem für wichtige strukturelle Komponenten wie Kapsid-, Tegument- und Hüllproteine zur Zusammensetzung neuer Virionen. [63, 84].

Die Replikation des viralen Genoms beginnt etwa 14-16 Stunden nach der Infektion und erfolgt nach dem sogenannten „*rolling circle*"-Mechanismus. Nach der Zirkularisierung des Genoms lagert sich der benötigte Enzymkomplex aus Helicase und Primase an den Ursprung der Replikation an. Dadurch folgt das einseitige Aufschneiden des DNA-Strangs. Es kommt so zur Freilegung des 3´ OH-Endes, welches nun als Primer verfügbar ist. Die fortlaufende Polymerisation erfolgt durch die virale DNA-Polymerase. Währenddessen wird das 5´-Ende ständig gelöst und dabei diskontinuierlich zum Doppelstrang vervollständigt. Durch die zirkularisierte Form der viralen DNA kommt es bei dieser Replikationsform zur kontinuierlichen Polymerisation, wobei DNA-Stränge mit konkatemerer Formation produziert werden. Dies bedeutet, dass der DNA-Strang mehrere Einheiten des viralen Genoms beinhaltet. Von den Konkatemeren werden bei der Verpackung des Virusgenoms in das Kapsid einzelne Volllängegenome abgetrennt [85]. Nach der Genomverpackung kommt es, während und durch den Transport über die innere Kernmembran, zur primären Tegumentierung und Umhüllung des Kapsids [20, 82]. Das primär verpackte Kapsid gelangt so in den perinukleären Raum. Anschließend erfolgt eine Fusion der primären Virushülle mit der äußeren Kernmembran. Das Produkt des Transports vom nukleären Bereich in das Zytoplasma stellt also wieder ein nicht umhülltes Nukleokapsid dar [82]. Im Zytoplasma befindet sich, ausschließlich in infizierten Zellen, kernnah, eine besondere Struktur: der sogenannte *„viral assembly complex*" (vAC). Er entsteht durch Umstrukturierung und Reformation zellulärer Membranen und beinhaltet Teile des Endoplasmatischen Retikulum (ER), Endosomen sowie Vesikeln des cis- und trans-Golgi- Netztwerks [39]. Für verschiedene Tegumentproteine konnte schon gezeigt werden, dass sie im vAC akkumulieren. Der vAC ist auch der Bereich, in welchem

die sekundäre Tegumentierung und Umhüllung stattfinden [113]. Diese Vorgänge sind in ihrer Komplexität noch nicht genau verstanden. Es scheint aber klar, dass vor allem Protein-Protein-Interaktionen eine große Rolle spielen [83]. Bei der Tegumentierung werden mehr als 35 verschiedene Tegumentproteine in das Virion eingebaut [82]. Die sekundäre Umhüllung ist der Prozess, durch welchen tegumentierte Kapside eine zelluläre Hüllmembran erhalten, in welche virale Glykoproteine eingebaut sind [113]. Dieser Prozess ist wahrscheinlich eng mit trans-Golgi-Vesikeln [43] und Membranen der Endosomen assoziiert [139]. Wobei auch hier der konkrete Mechanismus bislang unbekannt ist. Nach der sekundären Umhüllung liegen vollständig umhüllte Viruspartikel in Vesikeln vor, welche in Richtung Zellmembran transportiert werden. Dort fusioniert die Membran des Vesikels mit der Zellmembran und das reife Viruspartikel wird von der Zelle freigesetzt [84]. Es steht nun für den Beginn eines neuen Infektionszyklus bereit. Außer den infektiösen viralen Partikeln können auch die oben bereits beschriebenen, DNA-losen *Dense bodies* und NIEPS freigesetzt werden. Diese sind zwar in der Lage wieder in Zellen einzudringen, aber durch das fehlende Genom kommt es nicht zu einer Infektion.

## 1.6 Die Tegumentproteine von HCMV

Wie bereits beschrieben handelt es sich beim Tegument um eine amorphe Struktur zwischen dem viralen Nukleokapsid und der Hülle. Das Tegument besteht aus mehr als 25 verschiedenen viralen Tegumentproteinen, wobei ein Großteil dieser im Verlauf der Virusreplikation phosphoryliert vorliegt. Die Funktion dieser Modifikation ist allerdings noch unbekannt [141]. Neben ihrer Funktion als Strukturkomponente haben Tegumentproteine eine Reihe unterschiedlicher Funktionen wie z.B. immunomodulatorische Funktionen, Regulation zellulärer Signalwege und Regulation der viralen Genexpression. Andere Tegumentproteine wie z.B. das pUL48 besitzen enzymatische Aktivitäten. Innerhalb der *ß-Herpesviridae* gelten einige dieser Proteine wie z.B. das pUL48 und pUL47 als hoch konserviert [85]. Es wurde bislang keine gemeinsame Sequenz festgestellt, die die Lokalisation im Tegument erklären könnte [67]. Im reifen Virion wurden außer den viralen Proteinen noch über 70 Proteine zellulärer Herkunft gefunden, die meisten davon im Tegument [141].

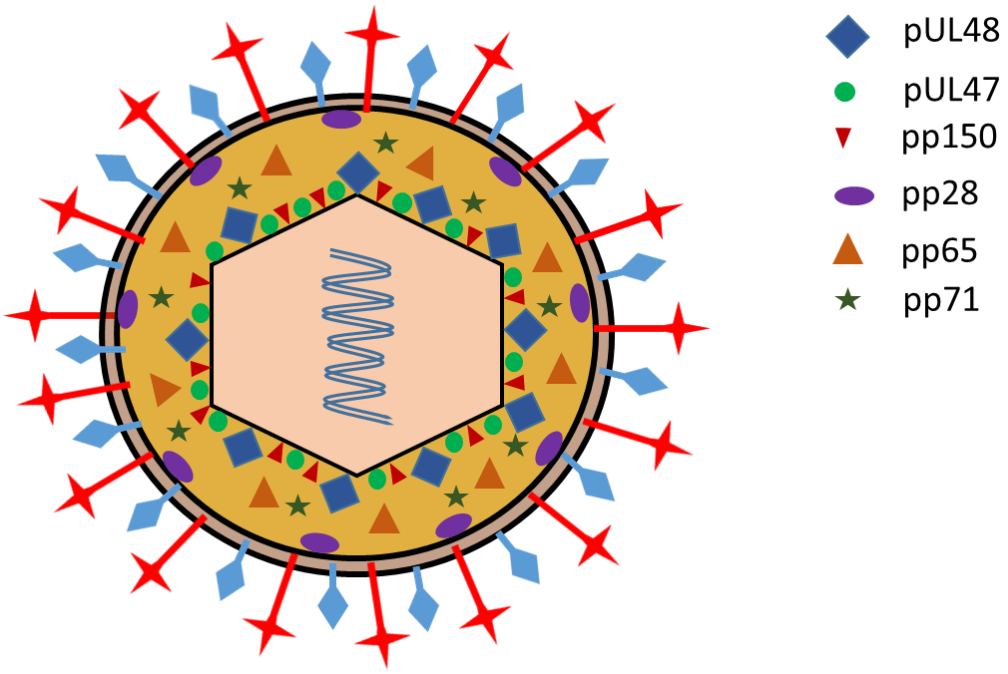



**Abbildung 5 Schematische Darstellung des HCMV-Partikels (Humanes Zytomegalie Virus) mit verschiedenen Tegumentproteinen**

Die Abbildung zeigt nicht maßstabsgetreu die Proteine der Tegumentschicht, gegliedert in inneres Tegument direkt am Kapsid mit pUL48 (blau), pUL47 (grün)und pp150 (rot) und äußeres Tegument hier mit pp28 (lila), pp65 (orange) und pp71 (dunkelgrün). Rechts die Legende der Symbole. Inhalt nach Kalejta RF in Microbiology and Molecular Biology Reviews 2008 [67].

Vereinfacht können im Tegument zwei Positionen unterschieden werden, das innere Tegument mit enger Beziehung zum Kapsid und das äußere Tegument (Abbildung 5) [67]. Zum inneren Tegument werden unter anderem pUL48 (Gegenstand dieser Arbeit), ein Interaktionspartner pUL47 [140] und das Protein pp150 gezählt. Durch die enge Assoziation mit dem Kapsid wird dem Komplex aus pUL48 und pUL47 auch eine wichtige Rolle beim Transport des Kapsids in Richtung des Zellkerns zugesprochen [8]. Weitere Aufgaben der Tegumentproteine verteilen sich auf den gesamten viralen Replikationszyklus und betreffen die Genexpression, z.B. pp71 (UL82) [67], die Replikation, Zusammen-/ und Freisetzung der Partikel. Für den Ablauf des viralen Replikationsprozess sind bisher vier Tegumentproteine als unabdingbar, bzw. essentiell, bekannt: pp150 (pUL32) [4, 42, 148], pUL48, pUL94 [34, 42] und pp28 (pUL99*)* [42]. Hierbei wird pp150 zusammen mit einem weiteren Protein pp65 am häufigsten im Tegument gefunden [67]. pp150 bindet früh an das Kapsid, wodurch selbiges stabilisiert wird [7]. Es wird davon ausgegangen, dass es deswegen für den Zusammenbau und auch die Freisetzung der neuen Viruspartikel essentiell ist [134]. pp28, ein Protein der späten Phase, soll eine wichtige Bedeutung für die finale Umhüllung besitzen, weil bei fehlendem pp28 keine infektiösen Viruspartikel mehr freigesetzt werden [120]. Ebenso wurden nach Infektion mit pUL94-knock-out-Mutanten keine infektiösen Viruspartikel freigesetzt, trotz unbeeinträchtigter DNA-Replikation und viraler Geneexpression. Vermutet wird, dass die Funktion des pUL94 im Zuge der Virusreplikation mit einer Interaktion mit pp28 in Verbindung steht [96]. Neben den Tegumentproteinen mit essentieller Funktion für die Virusreplikation kommen viele weitere nicht-essentielle Tegumentproteine mit zum Teil wichtiger Bedeutung vor. Bei vielen Tegumentproteinen verursacht ein „knock-out“ auf genetischer Ebene einen Wachstums-/Freisetzungsdefekt, welcher in seiner Ausprägung je nach Protein variieren kann. Für pUL97 beispielsweise ist ein schwerer Wachstumsdefekt mit einhergehendem starkem Titerabfall bekannt [97]. Für pp65 (pUL83), Bestandteil des äußeren Teguments, hingegen konnte nur ein schwacher Defekt mit maximal 10-fachem Abfall des Titers beobachtet werden [34].

Die Lokalisation der verschiedenen Tegumentproteine in der Zelle hängt von ihrer spezifischen Funktion ab. Dabei kann zwischen verschiedenen Lokalisationsmustern wie z. B. primärer Lokalisation im vAC oder initialer Lokalisation im Nukleus, mit Relokalisation im vAC in späten Infektionsstadien,

unterschieden werden. Letztgenanntes Lokalisationsmuster ist bisher für die Tegumentproteine pp71, pp150, pUL48, pp65 bekannt [18, 66, 67, 112, 126, 134]. pp71 beeinflusst im Kern die Transkription der „major IE“-Genregion, indem es die dazugehörigen Repressoren beeinflusst [94]. pp65 hingegen steigert durch Interaktion mit IF116 die Aktivität des entsprechenden Promotors [35]. Für beide ist die shuttling-Aktivität zwischen Nukleus und Zytoplasma eine wichtige Voraussetzung für ihre Funktionen während der Replikation und Expression viraler Gene [66]. Im Zuge des „*nucleocytoplasmic-shuttling*“ konnte für einige Tegumentproteine eine nukleare Import Sequenz (NLS) gefunden werden. Der Export wird über nukleäre Export Sequenzen (NES) vermittelt und ist häufig von dem zellulären Exportin CRM-1 abhängig. Für HCMV sind in vielen Fällen aber die genaue Lokalisation und Anlagerung der Tegumentproteine an das Kapsid nicht bekannt. Die partielle nukleäre Lokalisation einiger bedeutender Tegumentproteine lässt vermuten, dass der Prozess der Tegumentierung schon im Kern initiiert werden könnte. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Tegumentproteine, in allen Phasen, wichtige Bestandteile des viralen Replikationszyklus bilden. Genaue Kenntnisse der Funktion von Tegumentproteinen und der Mechanismen der Tegumentierung könnten zukünftig möglicherweise einen vollkommen neuen Ansatzpunkt für antivirale Strategien liefern.

## 1.7 Das Tegumentprotein pUL48

Gegenstand dieser Arbeit ist das Tegumentprotein pUL48, welches wegen seiner außergewöhnlichen Größe auch als *„High molecular weight protein“* (HMWP) bezeichnet wird. Sein Molekulargewicht von 253kDa und die Sequenzlänge von 2241 Aminosäuren machen es zum größten Protein von HCMV. pUL48 gilt als essentiell für den vollständigen viralen Replikationszyklus [42]. In jedem Virion finden sich ca. 1400 Kopien [141] davon eingebaut. Es ist aber auch Bestandteil von NIEPS und Dense bodies (DB) [5]. pUL48 ist, wie oben bereits erwähnt, Teil des inneren Teguments und eng mit dem Kapsid assoziiert. Daraus ergeben sich Vermutungen, dass es in den Transport des Kapsids zum Zellkern involviert sein könnte [67]. Bisher wurde außerdem eine enzymatische Funktion als deubiquitinierende Protease festgestellt [142]. Diese Funktion ist im N-Terminus des Proteins kodiert, wobei die Bedeutung dieser Funktion im HCMV-

Replikationszyklus noch nicht ganz geklärt ist [67]. Das Homolog für pUL48 bei den Alphaherpesviren heißt pUL36 und ist deutlich besser untersucht. Für pUL36 ist bekannt, dass es ebenfalls eine essentielle Funktion für die Replikation besitzt, ein wichtiger Grundstein der Tegumentierung ist und nach neuen Erkenntnissen der C-Terminus ebenfalls essentiell und möglicherweise für die Interaktion mit dem Kapsid verantwortlich ist [40, 74, 116]. Folglich übernimmt pUL36 im viralen Replikationszyklus der Alphaherpesviren eine ähnliche Funktion wie pUL48 für HCMV.

Gleichzeitig sind für dieses Protein innerhalb der Familie der Herpesviren konservierte funktionelle Domänen beschrieben [1]. Die Kombination dieser beiden Erkenntnisse führt zu der Hypothese, dass auch in pUL48 der C-Terminus eine essentielle, funktionelle Domäne enthält.

## 1.8 Transport zwischen Zellkern und Zytoplasma

Im Gegensatz zu den Prokaryoten werden in den eukaryotischen Zellen die funktionellen Kompartimente strikt voneinander getrennt. Durch die Kompartimentierung unterliegen komplexe Reaktion und Prozesse in der Zelle einem hohen Maß an Regulation. Zum Beispiel können Aktivatoren spezifischer Prozesse wie Promotoren der Transkription von ihrem Zielort der Gensequenz räumlich getrennt werden [32]. Die zwei bedeutendsten Kompartimente sind dabei der Zellkern als Ort der Transkription genetischer Information und das Zytoplasma, in welchem diese Information zu Proteinen translatiert wird. Der Transport zwischen diesen beiden Kompartimenten ist eine grundlegende Bedingung für das Funktionieren der eukaryotischen Zelle. In dieser Arbeit soll der Fokus auf dem Transport von Proteinen liegen, welcher allgemein als „*nucleocytoplasmic-shuttling*“ bezeichnet wird. Dieser Vorgang wird wiederum in zwei Transportprozesse unterteilt, den nukleären Import und den nukleären Export. Diese erfolgen über die Kernporen (NPCs, *nuclear pore complexes*), welche die physikalische Verbindung zwischen Kern und Zytoplasma darstellen. Vermittelt wird der Transport über die Proteinfamilie der β-Karyopherine, auch als Importine und Exportine bezeichnet [90]. Karyopherine erkennen und binden spezielle Sequenzen der Zielproteine, diese heißen NLS (*nuclear localisation signal*) und NES (*nuclear export signal*). Der

Transport dieser Komplexe ist abhängig vom Zyklus der Ran GTPase [28] (siehe Abbildung 6). Im Nukleus findet sich vorwiegend Ran GTP, während im Zytoplasma vorwiegend Ran GDP vorliegt. Die entsprechende Form bindet kompetitiv an den Komplex aus Protein und Karyopherin und die Trias wird durch die Kernporen transportiert. Am Zielort zerfällt sie wieder in die Einzelbestandteile. Im Fall des nukleären Imports bindet folglich die NLS im Zytoplasma an *Imp ortin α* oder *Importin β*, der Komplex interagiert mit dem NPC und wird in den Kern importiert (Abbildung 6). Hier kann RanGTP an das Importin binden und den Komplex wieder in seine ursprünglichen Bestandteile auflösen. Importin und RanGTP werden exportiert und stehen so wieder für nukleären Import zu Verfügung [9, 41, 64, 93]. Da der nukleäre Export vorrangiges Thema dieser Arbeit ist, wird er im folgenden Abschnitt detaillierter betrachtet.

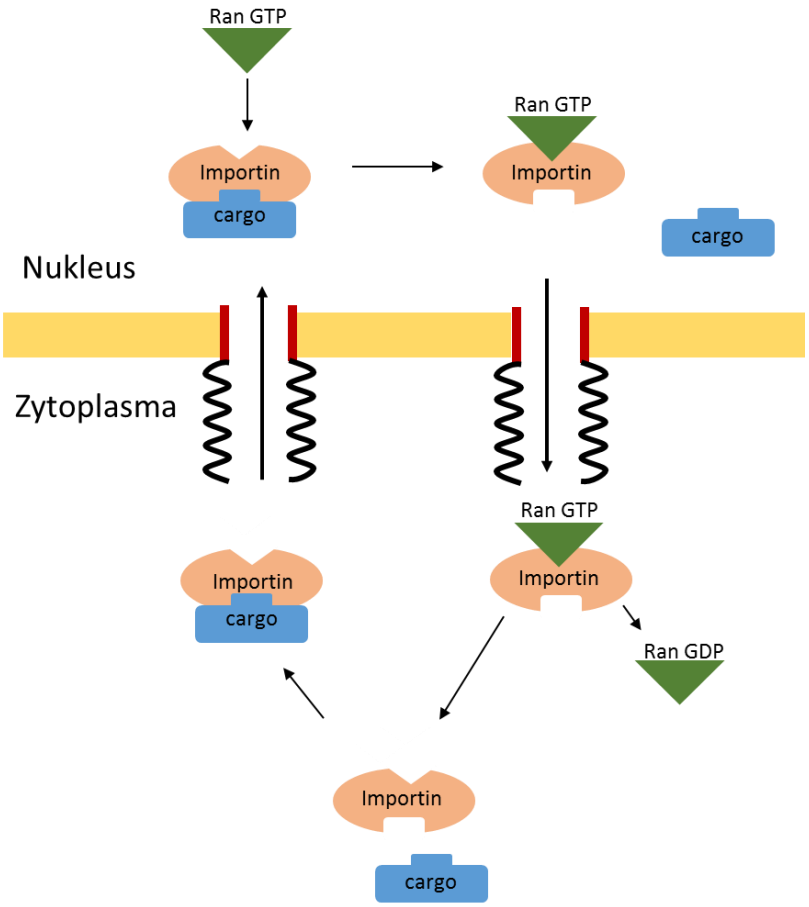



**Abbildung 6 Zyklus des nukleären Imports**

Die Abbildung zeigt schematisch den nukleären Import als Zyklus über die Kernporen. Die NPCs (nuclear pore complexes) werden durch  symbolisiert. Cargo steht für das gewünschte transportierte Protein. Inhalt der Abbildung gestaltet nach [Sorokin A.V. et al in Biochemistry (Moscow) ] [128]. Die nukleäre Membran ist in gelb dargestellt.

## 1.9 Nukleärer Export und die NES von Proteinen

Nukleärer Export ist eine essentielle Grundlage jeder eukaryotischen Zelle und ein hochgradig regulierter Prozess. Während kleine Proteine < 40-60 kDa und Ionen den Kern passiv verlassen können [147], sind größere Proteine an einen aktiven Export gebunden. Kernexport erfolgt durch die NPCs. Vermittelt wird der Transport über eine Bindung an Transportmoleküle, die als Exportine bezeichnet werden [31, 59]. Der wohl bekannteste Vertreter dieser Gruppe ist das *„Chromosome region maintenance protein 1*“ (CRM-1 auch Exoprtin-1 genannt) [2, 48, 129]. CRM-1 transportiert verschiedenste Proteine, z.B. die große und kleine Untereinheit der Ribosomen. Aber auch viele Viren nutzen nukleären Export und CRM-1 für ihren Replikationszyklus. Das bekannteste Beispiel dafür ist das *human immunodeficiency virus* (HIV), welches mit Hilfe von CRM-1 seine genomische RNA ins Zytoplasma transportiert [3]. Der Transport wird im Allgemeinen über die RanGTPase reguliert (siehe Abbildung 7). Vereinfacht dargestellt bindet das Protein, welches exportiert werden soll, über eine spezifische Aminosäuresequenz (nukleäres Exportsignal (NES)) im Kern an das Exportin (z.B. CRM-1). Es bildet sich ein Komplex aus drei Bestandteilen: dem gewünschten Protein, dem Exportin und RanGTP (siehe Abbildung 7). Durch Interaktion mit dem NPC wird der gesamte Komplex aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert. Hier kommt es zur Konversion von RanGTP zu RanGDP und zur Dissoziation des Komplexes in seine Einzelbestandteile [128]. Der CRM-1 abhängige nukleäre Export kann durch die Substanz Leptomycin B inhibiert werden, indem diese direkt an CRM-1 bindet [69]. NES sind klassischerweise kurze Abschnitte mit vier hydrophoben Aminosäuren in einer typischen Anordnung. Die bekanntesten zwei klassischen Prototypen sind erstens die PKI-NES (*Protein-Kinase A-Inhibitor*) mit der Formel $\Phi_1 xxx \Phi_2 xx \Phi_3 x \Phi_4$ [144], wobei Φ jeweils eine hydrophobe Aminosäure und x eine beliebige, oft polare Aminosäure repräsentiert. Die zweite klassische Anordnung entspricht der HIV-1 Rev NES: $\Phi_1 xx \Phi_2 xx \Phi_3 x \Phi_4$ [47]. Oft sind die Positionen der hydrophoben Aminosäuren (Φ) mit Leucinen besetzt, was solchen NES auch die Bezeichnung leucinreich eingebracht hat. Es können aber auch andere hydrophobe Aminosäuren wie Isoleucin, Valin oder Methionin vertreten sein. Neue Untersuchungen im Bereich der NES-Forschung lieferten nun Hinweise auf eine zusätzliche hydrophobe Aminosäure in der NES Konsensussequenz [60]. Diese

wurde durch ihre Positionierung vor $\Phi_1$ als $\Phi_0$ bezeichnet. So wurde die Sequenz der Rev NES zu $\Phi_0\Phi_1x\Phi_2xx\Phi_3x\Phi_4$ erweitert [60]

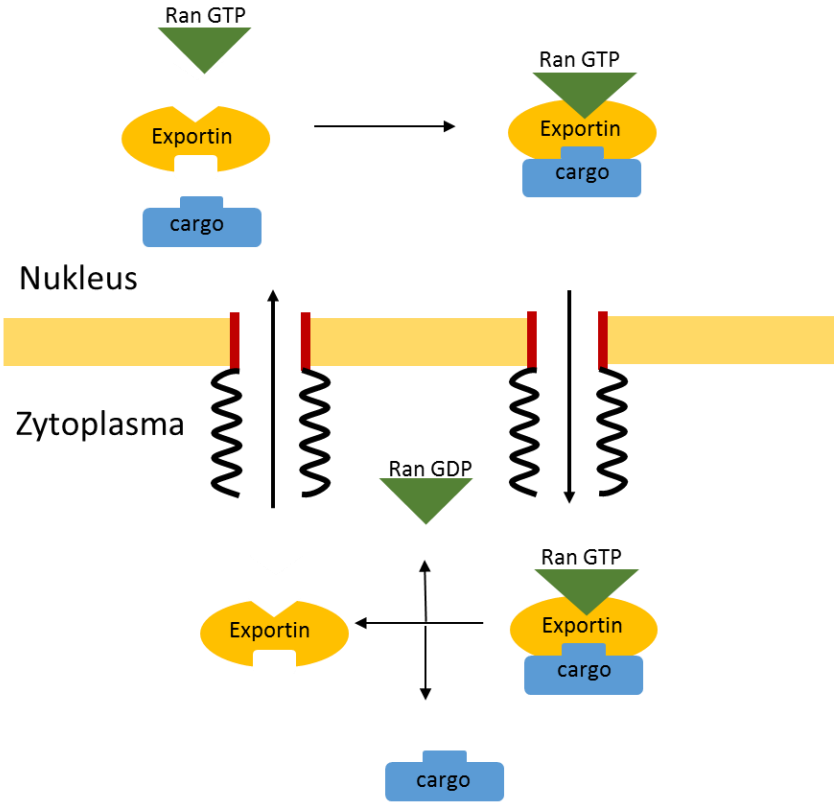



**Abbildung 7 Nukelärer Export als Zyklus**

Die Abbildung zeigt schematisch den energieabhängigen Export aus dem Zellkern ins Zytoplasma. Die nukleäre Membran ist in gelb dargestellt. Die NPCs (nuclear pore complexes) werden durch  symbolisiert. Cargo steht für das gewünschte, transportierte Protein. Inhalt der Abbildung modifiziert nach [Sorokin A.V. et al in Biochemistry (Moscow)] [128].

## 1.10 Ziele der Arbeit

HCMV ist auf Grund seiner Bedeutung in der Schwangerschaft und bei Immunsuppression und den mangelhaften therapeutischen Optionen ein sehr wichtiges, aktuelles Thema der medizinischen Forschung. Das genauere Verständnis der exakten Abläufe während des viralen Replikationszyklus spielt als Basis für zukünftige therapeutische Ansätze eine wichtige Rolle. Das essentielle Tegumentprotein pUL48 könnte solch einen Ansatz liefern. Ausgehend von der Hypothese, dass das „*nucleocytoplasmic-shuttling*“ von pUL48 essentiell für einen vollständigen viralen Replikationszylus ist, sollte im C-Terminus die funktionelle Domäne einer NES identifiziert und ihre Bedeutung analysiert werden. Umgesetzt wurde dieser theoretische Ansatz durch die Charakterisierung einer Virusmutante mit Mutationen der vermuteten NES-Sequenz. Dazu sollten zellbiologische Methoden wie Rekonstitution, Wachstumskinetiken und der Fokus-Expansion-Assay sowie proteinbiochemisch der Westernblot genutzt werden. Zur Lokalisationsuntersuchung des pUL48 sollte die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie verwendet werden. Zusammenfassend war das Ziel die Untersuchung des nukleären Exports von pUL48 und seiner Bedeutung für den gesamten viralen Replikationszyklus.

# 2 Material und Methoden

## 2.1 Material

### 2.1.1 Zelllinien und Medien

#### 2.1.1.1 Zelllinien

| Bezeichnung | Beschreibung |
|---|---|
| HFF- Zellen | primäre humane Vorhautfibroblasten |
| MRC-5 Zellen | Medial Research Council-5 Zellen, 1966 aus fetalem Lungengewebe erzeugte Zelllinie, Lungenfibroblasten |

#### 2.1.1.2 Medien für die Zellkultur

| Bezeichnung | Zusammensetzung |
|---|---|
| Zellmedium | MEM+ 10% FCS, 1% Glutamin, 1% Pen/Strep, 1% nicht essentielle AS |
| Starvation Medium | MEM+ 1% Glutamin, 1% Pen/Strep, 1% nicht essentielle AS |

### 2.1.2 Viren

| Bezeichnung | Beschreibung |
|---|---|
| WT (Wildtyp HCMV) | Aus sequenziertem pTB40/E- BAC4 rekonstituiertes Virus, ursprüngliche Abstammung aus klinischem Isolat TB40/E (Sinzger et al., 2008) |
| TBUL48- DelC80 | pUL-48-C-terminale Deletionsmutante, C-terminale Deletion der finalen 80 AS des pUL48 (857, Jens von Einem, Universitätsklinikum Ulm) |

| | |
|---|---|
| TB-UL48-DelC80rev | Revertante der pUL-48-C-terminalen Deletionsmutante (Alexandra Maselbas, Universitätsklinikum Ulm) |
| TBUL48-5LtoA | Mutante mit Punktmutation von 5 Leucinen im C-terminalen Ende des pUL48, ersetzt durch Alanine (Mutation an den Stellen 2213,2215,2218,2220,2223 Ivonne Brock) |
| TBUL48-DelC28 | Deletion der letzten C-terminalen 28 AS pUL48 (Alexandra Maselbas, Universitätsklinikum Ulm) |

### 2.1.3 Bakterien und Medien

#### 2.1.3.1 Bakterien

| Bezeichnung | Beschreibung |
|---|---|
| GS 1783 | Modifizierte E.coli für BAC-Mutagenese, Gregory Smith (USA) |

#### 2.1.3.2 Medien für die Bakterienkultur

| Bezeichnung | Zusammensetzung |
|---|---|
| LB-Medium | 10g Bacto-Trypton, 5g Bacto-Yeast, 10g NaCl auf 1l Aqua Bidest, mit NaOH auf einen pH von 7,5 eingestellt |
| LB-Medium für Agarplatten | 1l LB-Medium, 15g Bacto-Agar |
| SOB- Medium | 20g Bacto- Typton, 5g Bacto-Yeast, 0,5g NaCl, 2,5ml 1M KCl, auf 990ml Aqua Bidest, mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt, Zugabe von 10ml sterilem 2M $MgCl_2$ nach dem Autoklavieren |

| | |
|---|---|
| SOC-Medium | 10ml SOB-Medium, 100µl sterile 2M Glucose |
| Einfriermedium für Glycerinkulturen | 60% Glycerin, 40% SOB; Einfriermedium + 900µl gewünschte Bakterienkultur bei -75°C lagern |
| 2xYT- Medium | 16g Bacto-Trypton, 10g Bacto-Yeast, 5g NaCl, auf 1l Aqua Bidest, mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt |

### 2.1.4 Plasmide

| | |
|---|---|
| pEF-UL48 codon opt 1-2240 (1200 (M-1702-23)) | Das Plasmid enthält das Gen für pUL48 (#1536 Monika Dürre) |
| pTB40E | BAC-DNA des HCMV-Wildtyps (#442 Sinzger et al., 2008) |
| pEP-KanS | Plasmid mit enthaltenem Kann-I-SceI-Template für die BAC-Mutagenese (#52) [138] |

### 2.1.5 Primer

#### 2.1.5.1 PCR-Primer für die Herstellung der Revertante

| | |
|---|---|
| UL48 seq Ende M (#38) | 5´GCTGGTTAACAGACCGCCTGC3´ |
| UL48-1893-2241_for (#552) | 5´CACCGAATTCATGGTGACCGAGGGGTAACG3´ |

### 2.1.6 Primer für die BAC-Mutagenese

| | |
|---|---|
| UL48 seq Ende M (#38) | 5´GCTGGTTAACAGACCGCCTGC3´ |
| UL48-3 5'BamHI (#40) | 5´CAGTGGATCCGGTACCTTTCAACCGCGTACCAGTC3´ |
| aphAI-seq1(#5) | 5´GCAGTTTCATTTGATGCTCGATG3´ |

### 2.1.7 Antikörper

#### 2.1.7.1 Primärantikörper

| Bezeichnung | Hersteller | Verdünnung |
|---|---|---|
| Anti-Aktin (Maus) | Sigma Aldrich GmbH Steinheim | 1:2500 (WB) |
| Anti-IE (Maus) 63-27 | Hybridoma-Überstand Universitätsklinikum Ulm | 1:1 (IF),(ZK) |
| Anti-MCP (Maus) | Hybridoma-Überstand Universitätsklinikum Ulm | 1:2,5 (WB) |
| Anti-pUL48 (Kaninchen) | Jens von Einem, Universitätsklinikum Ulm (043) | 1:400 (WB) |
| Anti-pUL48 (Kaninchen) | Jens von Einem, Universitätsklinikum Ulm (085) | 1:200 (IF) |
| Anti-Xpl (pp150, Maus) | Scholl et al.; 1998 | 1:500 (IF) |

#### 2.1.7.2 Sekundärantikörper

| Bezeichnung | Hersteller | Verdünnung |
|---|---|---|
| Ziege-anti-Maus IgG Alexa Fluor ® 488 F(ab´) 2 | Molecular Probes, Oregon | 1:1000 (IF) |
| Ziege-anti-Maus IgG Alexa Fluor ® 555 F (ab') 2 | Molecular Probes, Oregon | 1:1000 (IF) |
| Ziege-anti-Kaninchen IgG Alexa Fluor ® 555 F (ab') 2 | Molecular Probes, Oregon | 1:1000 (IF) |

| | | |
|---|---|---|
| Ziege-anti-Maus HRP-gekoppelt | DAKO Cytomation A/S, Kopenhagen | 1:10000 (WB) |
| Ziege-anti-Kaninchen HRP-gekoppelt | Millipore, Schwalbach | 1:10000 (WB) |

### 2.1.8 Enzyme

| Bezeichnung | Hersteller |
|---|---|
| Taq-Polymerase | New England Biolabs, Frankfurt |
| Phusion™ Hot Start | New England Biolabs, Frankfurt |
| High-Fidelty DNA- Polymerase | Finnzymes, Vantaa, Finnland |
| RNase A | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |

In den Reaktionen mit diesen Enzymen wurden die dafür vorgesehenen Puffer der entsprechenden Hersteller verwendet.

### 2.1.9 Antibiotika

| Antibiotikum | Hersteller | Konzentration |
|---|---|---|
| Carbenicillin | AppliChem GmbH, Darmstadt | 100µg/ml |
| Chloramphenicol | Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim | 34µg/ml |
| Kanamycin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim | 50µg/ml |
| Penicillin/Streptomycin | PA A Laboratories GmbH Pasching | 100units/ml/100µg/ml |

### 2.1.10 Chemikalien

| Bezeichnung | Hersteller |
|---|---|
| AEC (3-Amino-9-ethylcarbazol)-Tabletten | Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim |
| Aqua Bidest | Universität Ulm |
| Arabinose | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| ß-Mercaptoethanol | Merck, Schuchardt, Hohenbrunn |
| Bovines Serum Albumin (BSA) | Serva, Heidelberg |
| Bromphenolblau | Serva, Heidelberg |
| Cycloheximid (CHX) | Sigma-Aldrich, Buchs – Schweiz |
| DAPI (4′,6-Diamidin-2-phenylindol) | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| DMSO (Dimethylsulfoxid ($C_2H_6OS$)) | Serva, Heidelberg |
| EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) | Biochrom KG, Berlin |
| Essigsäure ($C_2H_4O_2$) | Merck, Darmstadt |
| Ethanol ($C_2H_6O$) | Sigma-Aldrich, Buchs, Schweiz |
| Ethidiumbromid | Roth, Karlsruhe |
| FCS (fetales Kälberserum) | Gibco BRL, Eggenstein |
| Gamunex 10% | Talecris, NC, USA |
| Glucose | Merck, Darmstadt |
| Glycerin | Roth, Karlsruhe |
| Glycin | AppliChem, Darmstadt |
| Salzsäure (HCl) | Merck, Darmstadt |

| | |
|---|---|
| Isopropanol ($C_3H_8O$) | Sigma-Aldrich, Buchs, Schweiz |
| Kaliumacetat ($C_2H_3KO_2$) | Merck, Darmstadt |
| Kaliumchlorid (KCl) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Kaliumdihydrogenphosphat ($KH_2PO_4$) | Merck, Darmstadt |
| Leptomycin B | Sigma Aldrich, München |
| L-Glutamin (200mM) | PAA Laboratories, Pasching |
| Magermilchpulver | Saliter, Augsburg |
| MEM-Medium | Gibco BRL, Eggenstein |
| Methanol ($CH_4O$) | Sigma-Aldrich, Buchs, Schweiz |
| Magnesiumdichlorid ($MgCl_2$) | Merck, Darmstadt |
| Natriumacetat ($C_2H_3NaO_2$) | Merck, Darmstadt |
| Natriumchlorid (NaCl) | AppliChem, Darmstadt |
| Natrium-Desoxycholat | Merck, Darmstadt |
| Natriumdihydrogenphosphat ($NaH_2PO_4$) | Merck, Darmstadt |
| Natriumfluorid (NaF) | Merck, Darmstadt |
| Natriumhydroxid (NaOH) | Merck, Darmstadt |
| Nichtessentielle Aminosäuren | Biochrom, Berlin |
| N-N-Dimethylformamid | Merck, Darmstadt |
| Opti-MEM®-Medium | Gibco BRL, Eggenstein |
| PageRuler Plus Prestained | Thermo Scientific |

| | |
|---|---|
| Protein Ladder | |
| SDS (sodium dodecyl sulphate) | Fluka Chemie, Buchs, Schweiz |
| SeaKem® LE-Agarose | Lonza Group AG, Basel, Schweiz |
| TEMED (Tetramethylethylendiamin) | Serva, Heidelberg |
| Tris (Trishydroxymethylaminomethan) | USB, Cleveland, USA |
| TritonX-100 | Serva, Heidelberg |
| Trypsin-EDTA-Lösung | PAA Laboratories, Pasching |
| Tween-20 | Merck, Darmstadt |
| Wasserstoffperoxid ($H_2O_2$) (30 %) | Baker Deventer, Niederlande |

### 2.1.11 Lösungen

#### 2.1.11.1 Lösungen für BAC-/Plasmid-Minipräparation

| Bezeichnung | Zusammensetzung |
|---|---|
| P1 | 50mM Tris-HCl pH 8,0, 10mM EDTA, RNAse direkt vor Gebrauch zugeben (Endkonzentration 100µg/ml) |
| P2 | 200mM NaOH, 1% SDS |
| P3 | 3M Kaliumacetat (pH 5,5) |
| TE-Puffer | 10mM Tris, 1mM EDTA, (Einstellung: pH 7,4 einstellen) |

#### 2.1.11.2 Lösungen für SDS-PAGE und Western Blot

| Bezeichnung | Zusammensetzung |
|---|---|
| APS-Lösung 10% | 1g Ammoniumpersulfat, auf 10ml Aqua Bidest |
| Blocking-Puffer | 100ml 0,3% PBST-Lösung, 5g Magermilchpulver |
| 10x Lämmli-Puffer | 30g Tris, 144g Glycin, 10g SDS, auf 1l Aqua Bidest |
| Nassblot-Transferpuffer | 9,1g Tris HCl, 43,24g Glycin, 300ml Ethanol, auf 2l Aqua Bidest |
| 10x PBS | 80g NaCl, 14,4g $Na_2HPO_4$ x 7 $H_2O$, 2,4g $KH_2PO_4$, 2g KCl, auf 1l Aqua Bidest (Einstellung auf pH 7,4 mit HCl) |

| | |
|---|---|
| PBST 0,3% | 100 ml 10x PBS, 3 ml Tween 20, auf 1l Aqua Bidest |
| Ripa-Puffer | 6,84ml 0,1M $Na_2HPO_4$, 3,16ml 0,1M $NaH_2PO_4$, 1ml Triton X-100, 1ml 10%-SDS, 2,0 ml 0,5M EDTA, 0,17 g NaF, 1g Na-Desoxycholat, auf 100 ml Aqua Bidest |
| 4x-SDS-Ladepuffer | 2ml 0,5M Tris-HCl pH 6,8, 1,6ml Glycerin, 3,2ml 10% SDS, 800µl ß-Mercaptoethanol, 400µl 2% Bromphenolblau, auf 8ml Aqua Bidest |
| Stripping-Puffer | 80ml 78,125mM Tris-HCl (pH 6,7), 880µl β-Mercaptoethanol, 20ml 10% SDS |

#### 2.1.11.3 Lösungen für die Zellkultur

| Bezeichnung | Zusammensetzung |
|---|---|
| AEC-Lösung (2ml) | 400µl AEC-Stocklösung, 1600µl 50mM Natriumacetatpuffer, 5µl $H_2O_2$ |
| AEC-Stocklösung | 1 Tablette AEC in 4ml N-N-Dimethylformamid gelöst |
| Natriumacetatpuffer 50mM | 2,05g Natriumacetat, auf 500ml Aqua Bidest, (Einstellung mit Essigsäure auf pH 5) |
| Paraformaldehyd 4% | 0,01M PBS mit 4% Paraformaldehyd (Einstellung auf pH 7,2 mit NaOH) |
| PBS 0,01M | 8,5g Nacl, 1,36g $KH_2PO_4$ auf 1l Aqua Bidest (Einstellung auf pH 7,8) |
| PBS 0,01M/1% BSA | 10g BSA auf 1l 0,01 M PBS (steril filtriert) |

| | |
|---|---|
| PBS 0,01M/EDTA | 2% EDTA und 0,01M EDTA |

#### 2.1.11.4 Lösungen für die Immunfluoreszenz

| | |
|---|---|
| IF- Blockinglösung | 0,01M PBS und 5% FCS |
| IF-Permeabilisierungslösung | 0,01M PBS und 0,1% Triton X-100 |
| IF-Waschlösung | 0,1% Triton X-100 in PBS 0,01M/ BSA 1% |

#### 2.1.11.5 Lösungen zum Blockieren der Proteinsynthese

| | |
|---|---|
| Cycloheximid-Stocklösung | 500µg in 1ml MEM |
| Cycloheximid-Arbeitslösung | 50µg in 1ml MEM |

#### 2.1.11.6 Lösungen zur Blockierung des nukleären Exports

| | |
|---|---|
| Leptomycin B- Stocklösung | 5µg in 1ml MEM |
| Leptomycin B- Arbeitslösung | 10ng in 1ml MEM |

#### 2.1.11.7 Weitere Lösungen

| Bezeichnung | Zusammensetzung |
|---|---|
| Agarosegel 0,8% | 0,8g SeaKem LE Agarose, 2,5µl Ethidiumbromid, 100ml TAE- Puffer (1x) |
| Arabinoselösung 10% | 6g Arabinose und 60ml LB-Medium (steril filtriert) |

| | |
|---|---|
| 10x TAE-Puffer | 48,4g Tris, 2,92g EDTA, 10ml Eisessig auf 1l Aqua Bidest (Einstellung auf pH 8,2) |

### 2.1.12 Gele für SDS-Page

**Tabelle 1 Zusammensetzung der SDS-Gele für den Westernblot**

| **Trenngel** | **7,5% (2 Gele)** |
|---|---|
| $H_2O$ (µl) | 4845 |
| 1,5 M Tris (pH 8,8, in µl) | 2500 |
| 10% SDS (µl) | 100 |
| 30% Acrylamid (µl) | 2500 |
| 10% APS (µl) | 50 |
| TEMED (µl) | 5 |
| Gesamtvolumen (µl) | 10000 |

| **Sammelgel** | **3,9% (2 Gele)** |
|---|---|
| $H_2O$ (µl) | 3020 |
| 1,5 M Tris (pH 8,8 in µl) | 1250 |
| 10% SDS (µl) | 50 |
| 30% Acrylamid (µl) | 650 |
| 10% APS (µl) | 25 |
| TEMED (µl) | 5 |
| Gesamtvolumen (µl) | 5000 |

### 2.1.13 Verbrauchsmaterialien

| Bezeichnung | Hersteller |
|---|---|
| 6x DNA Loading Dye | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA |
| dNTP-Mix (10mM) | Abgene, Hamburg |
| Einmalplastikpipetten Sarstedt | Sarstedt, Nürnbrecht |
| Einmalspritzen BD Plastipak™ | Becton, Dickinson and Company, Heidelberg |
| Elektroporationsküvetten | Peqlab, Erlangen; Biorad |
| Eppendorfreaktionsgefäße (1,5ml, 2ml) | Eppendorf, München |
| Falcon-Tubes (15ml, 50ml) | Becton Dickinson, New Jersey–USA |
| Filterpapier | Bio-Rad, Hercules CA, USA |
| GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit | Sigma-Aldrich, St Louis, USA |
| GeneRuler 1kb DNA Ladder | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| High Pure Viral Nucleic Acid Kit | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| HiYield® PCR Clean-up/Gel Extraction Kit | Süd-Laborbedarf GmbH, Gautin |
| Handschuhe (NitraTex) | Ansell GmbH, München |
| IMM ibidi Mounting Medium | Ibidi, Martinsried |
| Impfösen | VWR International, Darmstadt |

| | |
|---|---|
| Kryoröhrchen (2ml) | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Küvetten | VWR International bvba, Leuven |
| Mull | NOBA Verbandmittel Danz, Wetter |
| NucleoBond® Xtra Midi-Kit | Macherey-Nagel, Düren |
| Parafilm | BEMIS, Neenah, USA |
| PCR-Tubes | Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf |
| Petrischalen Cellstar | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen |
| Plastikcaps Bakterienkultur | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen |
| PVDF-Membran | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| Spritzenvorsatzfilter (0,4µM) | Pall GmbH, Dreieich |
| Sterilium | Bode Chemie, Hamburg |
| Zellkulturflaschen (T25, T75) | Greiner Bio One, Frickenhausen |
| Zellkulturplatten (6, 12, 24, 48, 96 well) | Greiner Bio One, Frickenhausen |

### 2.1.14 Geräte und Programme

| Bezeichnung | Hersteller |
|---|---|
| AxioCam MRm | Zeiss, Jena |
| Axiovision 4.8.2 | Zeiss, Jena |
| Bakterienschüttler Certomat IS | Braun Biotech International, Melsungen |
| Bechergläser | Schott Duran® Group, Mainz |

| | |
|---|---|
| Bio-Photometer | Eppendorf, Hamburg |
| Bio-Rad CriterionBlotter | Bio-Rad, Hercules, USA |
| Bio-Rad Gene Pulser™ | Bio-Rad, Hercules, USA |
| Bio-Rad Pulse Controller | Bio-Rad, Hercules, USA |
| Blockthermostat BT 100 | Kleinfeld Labortechnik GmbH, Gehrden |
| Brutschrank Hera Cell | Heraeus, Hanau |
| Bunsenbrenner | USBECK, Rade vorm Wald |
| CLC Main Workbench 7 | CLC bio, Aarhus, Dänemark |
| Electrophoresis Cell Run one™ | EmbiTec, San Diego, CA, USA |
| Eppendorf Mixer 5432 | Eppendorf, Hamburg |
| Eppendorf Thermomixer compact | Eppendorf, Hamburg |
| Erlenmeyerkolben | Schott Duran® Group, Mainz |
| Feinwaage AJ 100 | Mettler Toledo GmbH, Gießen |
| Fireboy eco und plus | Integra Bioscience GmbH, Fernwald |
| Fluoreszenzmikroskop Axio-Observer.Z1 | Zeiss, Jena |
| Fluoreszenzmikroskop Axiovert 2000 | Zeiss, Jena |
| Folienschweißgerät | Sealmaster 421 AudionElektro GmbH, Kleve |
| FUSION SL | Vilber Lourmat, Eberhardzell |
| FusionCapt Advance Solo 4 16,07 | Vilber Lourmat, Eberhardzell |

| | |
|---|---|
| Gel Doc XR+ | Bio-Rad, Hercules CA, USA |
| Glasflaschen | Schott Duran® Group, Mainz |
| Glaspipetten | Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt |
| Glasplatten für SDS-Gele | Biostep, Jahnsdorf |
| Gefrierschrank (-70 °C) Hera freeze | Heraeus, Hanau |
| Hybridization Incubator Model 2000 | Micro Robbins Scientific Corp, Sunnyvale, USA |
| Image Lab 5.0 | Bio-Rad, Hercules CA, USA |
| Kühlschränke | Robert Bosch GmbH, Gerlingen;<br>Siemens AG, München;<br>Liebherr Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen |
| Labcycler | SensoQuest, Göttingen |
| Lichtmikroskop | Carl Zeiss AG, Oberkochen |
| Messzylinder | Schott Duran® Group, Mainz |
| Mikroliterspritze | VWR International bvba, Leuven |
| Mikrowelle Bosch MG 800 | Bosch, Gerlingen |
| NetNES1.1Server | Center for Biological Sequence Analysis<br>Department of Systems Biology<br>Technical University of Denmark |
| Neubauer Zählkammer | Brand, Wertheim |
| pH-Meter pH526 | WTW GmbH, Weilheim |
| Pipetten (Eppendorf) | Eppendorf AG, Hamburg |

| | |
|---|---|
| Pipetten (Gilson) | Middelton, WI, USA |
| Pipettierhilfe Pipetboy plus | TecNoMara GmbH |
| Pipettierhilfe Pipetus-Akku | Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.KG, Eberstadt |
| Qubit™ Fluorometer | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| Schüttelwasserbad GFL 1083 | GFL, Burgwedel |
| Schüttler EB Swip | Edmund Bühler GmbH, Hechingen |
| Schwämme Blotting | Bio-Rad, Hercules CA, USA |
| SDS-Page-Kammer | Bio-Rad, Hercules, USA |
| Sterilbank Hera safe | Heraeus, Hanau |
| Sterilbank Lamin Air HBB 2472S | Heraeus, Hanau |
| Ultraschallgerät Sonifier B12 | Gerhard Heinemann Laboratorium Ausrüstung, Schwäbisch Gmünd<br>Vacupack Plus Krups, Solingen |
| Vortexer Vortex Genie2™ | Bachofer, Reutlingen |
| Waage PM 2000 | Mettler Toledo GmbH, Gießen |
| Zentrifuge Beckmann | Beckmann, München |
| Zentrifuge Beckmann Avanti JA14 | Beckmann, MünchenCoulter |
| Zentrifuge Eppendorf 541 | Eppendorf, München Coulter Allegra™ 6 |

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Vervielfachung doppelsträngiger DNA-Abschnitte und wurde im Perkin Elmer Thermocycler durchgeführt. Als Enzym wurde die Phusion™ Hot Start High-Fidelity DNA-Polymerase verwendet. Besondere Merkmale dieses Enzyms sind eine sehr hohe Lesegenauigkeit, geringe Ausfallraten und kurze Elongationszeiten (15- 45s für 1kb). Die verwendeten Primer (siehe Material) wurden mittels VectorNTI Advance™ (Invitrogen) ausgesucht und die Annealing-Temperatur betrug 2°C höher als die niedrigste Schmelztemperatur der verwendeten Primer. Die Zusammensetzung der PCR-Ansätze und ein PCR-Programm sind in den Tabellen 2 und 3 angegeben.

**Tabelle 2: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (Polymerase- Kettenreaktion)**

| | |
|---|---|
| Template (10ng/µl) | 1µl |
| dNTPs (10mM) | 1µl |
| 5x HF-Puffer | 10µl |
| 5´-Primer (10pM) | 1µl |
| 3´-Primer (10pM) | 1µl |
| Phusion™ Polymerase | 0,5µl |
| Ad $H_2O$ | 50µl |

**Tabelle 3: PCR-Programm für die Phusion™ High-Fidelity DNA-Polymerase**

| Schritt | Durchführung | Zeit | Temperatur | |
|---|---|---|---|---|
| Schritt 1 | Initiale Denaturierung | 30s | 98°C | |
| Schritt 2 | Denaturierung | 10s | 98°C | 30 Zyklen |
| Schritt 3 | Annealing | 20s | 62°C | |
| Schritt 4 | Elongation | 30s | 72°C | |
| Schritt 5 | Finale Elongation | 5min | 72°C | |
| Schritt 6 | | ∞ | 4°C | |

Im Anschluss an die PCR wurden die Produkte mit Hilfe der Gelelektrophorese im Agarosegel auf ihre Größe überprüft.

### 2.2.2 Markerlose BAC-Mutagenese

Ein „*bacterial artificial chromosome*“ (BAC) ist ein sogenanntes F-Plasmid, welches in *Escheria coli* (E.coli) vervielfältigt und verändert werden kann. Diese Vektoren können eine Kapazität von bis zu 300kbp besitzen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein BAC mit dem gesamten HCMV-Genom verwendet. Die BAC-Mutagenese dient der Erzeugung beliebiger Mutationen in der HCMV Gensequenz. Die Methode wurde von K. Tischer (2006) genau beschrieben und beruht prinzipiell auf zwei homologen Rekombinationsereignissen [137]. Im Zuge der ersten Rekombination werden die gewünschte Mutation und ein Selektionsmarker eingefügt. Dieser wird während der zweiten Rekombination wieder entfernt und es verbleibt nur die gewünschte Mutation. Für diese Arbeit wurde im Tegumentprotein pUL48 eine Deletion der letzten 28 C-terminalen Aminosäuren erzeugt.

#### 2.2.2.1 Erstellung des Transferkonstrukts

Im ersten Rekombinationsschritt wird ein Transferkonstrukt mittels PCR generiert, welches die gewünschte Mutation und den Selektionsmarker Kanamycin in das HCMV-BAC inseriert. Zur Erstellung des Transferkonstrukts mittels PCR wurden spezielle Primer benötigt, die mit Hilfe des Programms VectorNTI Advance™ 9.1 (Invitrogen) konstruiert wurden. Diese Primer enthielten jeweils, beginnend am 5'-Ende, 40 Nukleotide vor der gewünschten Deletion und 20 Nukleotide danach. An das 3´-Ende wurden dann noch die Primersequenzen zur Amplifikation der Gensequenz der Kanamcyin-Kassette und Endonuklease I-SceI-Schnittstelle angehängt (Primer siehe Material). Die Herstellung der Primer erfolgte durch die Firma Sigma-Aldrich. Als Enzym wurde die Taq-Polymerase verwendet. Die PCR zur Generierung des Transferkonstrukts ist in Tabellen 4 und 5 angegeben.

**Tabelle 4: Zusammensetzung PCR (Polymerase-Kettenreaktion) für die BAC-Mutagenese**

| | |
|---|---|
| 10x ThermoPol-Puffer | 5µl |
| dNTPs (10mM) | 1µl |
| Template ep Kan/I-SceI (10ng/µl) | 2,4µl |
| Primer 5´ (10pM) | 1µl |
| Primer 3´ (10pM) | 1µl |
| Taq-Polymerase | 0,5µl |
| Ad $H_2O$ | 39,1µl |

**Tabelle 5: Programm für die Taq-Polymerase**

| Schritt | Zeit | Temperatur | |
|---|---|---|---|
| Initiale Denaturierung | 2min | 95°C | |
| Denaturierung | 20s | 95°C | 10 Zyklen |
| Annealing | 20s | 93,6°C | |
| Extension | 80s | 68°C | |
| Denaturierung | 30s | 95°C | |
| Extension | 2min | 68°C | |
| Finale Extension | 7min | 68°C | |

Mittels Gelelektrophorese folgte die Überprüfung des PCR-Produkts auf seine Größe. Bei Bestätigung der erwarteten Größe wurde das PCR-Produkt aus dem Gel aufgereinigt. Dafür wurde der PCR Clean up Gel Extraction-Kit (Hi-Yield® PCR-Clean Up/Gel Extraction) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet. Ein Teil des aufgereinigten Konstrukts wurde erneut mit eine Gelelektrophorese kontrolliert. Weiterhin wurde unter Einsatz des Qubit™ Fluorometers die DNA-Konzentration ermittelt (nach Protokoll des Herstellers). Sie betrug stets zwischen 30-70ng/µl. Die Überprüfung diente als grobe Richtlinie zur Abschätzung der enthaltenen DNA-Menge. Standardmäßig wurden 5µl oder 7µl pro Elektroporation eingesetzt. Nun konnte die Transformation in elektrokompetente Bakterien erfolgen.

#### 2.2.2.2 Transformation von Bakterien mittels Elektroporation

Der nächste Schritt war nun das Einbringen des generierten Transferkonstrukts in rekombinationskompetente *E. coli*. Es handelte sich hier um Bakterien mit der Bezeichnung GS1783, die ein BAC mit dem kompletten HCMV-Genom enthielten. Diese standen bereits zur Verfügung und waren bereits elektrokompetent.

Für die Transformation wurden die Bakterien zunächst langsam auf Eis aufgetaut. Die folgende Elektroporation und die anschließenden Schritte wurden in möglichst kurzer Zeit durchgeführt, um eine hohe Transfektionseffizienz zu erzielen. Pro

Ansatz wurde je ein 50µl Bakterienaliquot verwendet. Das Transferkonstrukt (standardmäßig 5 oder 7µl) wurde zu den GS Bakterien gegeben und das Gemisch in eine Elektroporationsküvette (1mm) pipettiert. Dabei wurden zwei Ansätze mit unterschiedlicher DNA-Menge (5µl und 7µl) pro Elektroporation gewählt. Es folgte die Elektroporation bei 1,25kV, 25µF und einem Widerstand von 200Ohm. Die Zeitkonstante lag dabei stets über 4ms. Die Bakterien wurden direkt im Anschluss, möglichst schnell, in 900µl SOC- Medium aufgenommen und in Eppis überführt. Um die erste homologe Rekombination einzuleiten, kamen die Bakterien mitsamt der eingebrachten DNA bei 32°C für eine Stunde in den Schüttler. Durch die Integration des Transferkonstrukts in die BAC-DNA mittels Rekombination der homologen Bereiche des Transferkonstrukts und des HCMV-Genoms erhielten die Bakterien, welche das Konstrukt erfolgreich integriert hatten, eine Kanamycin- Resistenz. Nach einer Stunde Inkubation wurden die Bakterien kurz bei 4000UpM pelletiert und in ca. 100µl Überstand resuspendiert und zur Selektion auf LB-Agarplatten mit Kanamycin (Endkonzentration: 50µg/ml)und Chloramphenicol (Endkonzentration: 34µg/ml) ausplattiert. Die Platten wurden bei 32°C über Nacht im Brutschrank inkubiert. Dadurch wurde nur auf Bakterien mit erfolgreich integriertem Transferkonstrukt selektiert, da nur diese eine Kanamycin-Resistenz enthielten und so auf dem Kanamycin-haltigen Agar wachsen konnten.

#### 2.2.2.3 Isolierung der BAC-DNA

Als nächster Schritt wurde die BAC-DNA aus den positiv selektierten Bakterienklonen durch eine BAC-Minipräparation isoliert. Dafür wurden je vier, über Nacht gewachsene, Kolonien pro Ansatz (unterschiedliche DNA-Elektroporationsmengen) in jeweils 3ml Kanamycin- und Chloramphenicol- haltigem 2xYT-Medium angeimpft (Endkonzentration Kanamycin 50µg/ml und Chloramphenicol 34µg/ml) und erneut bei 32°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Bakterienkulturen bei 4500UpM (10min) pelletiert. Das Bakterienpellet wurde in jeweils 300µl P1 mit RNAse (Endkonzentration: 100µg/ml) resuspendiert. Die Zugabe von 300µl P2 führte zur Lyse der Bakterien. Dieser Prozess wurde durch Zugabe derselben Menge P3 nach ca. fünf Minuten beendet. Die Lysate inkubierten schließlich 20 Minuten auf Eis, um dann für weiter 20 Minuten bei 13000 UpM und 4°C erneut zentrifugiert zu werden. Die Fällung der DNA erfolgte durch

die Zugabe von Isopropanol. Dazu wurden zuerst jeweils 800µl des Überstands pro Bakterienkolonie entnommen und mit 450µl Isopropanol versetzt. Das Gemisch wurde unter den gleichen Bedingungen wiederholt zentrifugiert (mindestens 10min, 13000UPM). Die entstandenen Pellets wurden mit jeweils 500µl Ethanol (70%) gewaschen, fünf Minuten bei RT und 13 000UpM zentrifugiert und anschließend bei RT getrocknet. Sobald das Ethanol vollständig verflüchtigt war, wurde das DNA-Pellet in 50µl TE-Puffer gelöst. Zur Kontrolle für eine erfolgreiche und korrekte Integration wurde eine Kontroll-PCR durchgeführt. Die Produkte daraus wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und die Klone mit korrektem Bandenmuster ausgewählt, dies waren die Klone 1,2 und 8.

#### 2.2.2.4 Auflösung der GS-Bakterien

In einem zweiten Rekombinationsschritt wurde die Kan-I-SceI-Kassette aus den Klonen mit erfolgreicher erster Rekombination wieder entfernt. Durch Arabinose-Zugabe wurde die Expression der Endonuklease I-SceI aktiviert, deren Aktivität die Entfernung der Kanamycin-Kassette durch eine zweite Rekombination induziert.

Acht ausgewählten Bakterienklone wurden in 1ml LB-Medium mit Chloramphenicol (Konzentration: 34µg/ml) angeimpft und im Bakterienschüttler (32°C) für 2h inkubiert. Sie wurden visuell kontrolliert, sobald in der Lösung eine leichte „Bakterienwolke“ zu erkennen war, wurde 1ml 2%ige Arabinoselösung (in LB-Medium und Chloramphenicol, Endkonzentration 34µg/ml) zugegeben. Die Induktion des Restriktionsenzyms I-SceI erfolgte durch einstündige Inkubation bei 32°C. Danach sollten die Rekombinationsenzyme der GS-Bakterien exprimiert werden. Dies geschah durch eine 20-minütige Hitzeinduktion (42°C). Anschließend kam es bei der weiteren Inkubation von mehreren Stunden bei 32°C zur homologen Rekombination, was zur Entfernung der Kanamycin-Kassette führte. Anschließend wurde die Bakteriendichte durch Bestimmung der $OD_{600}$ (*optical density* bei 600nm) der einzelnen Bakterienkulturen ermittelt. Lag diese über 0,5, wurden die Kulturen 1:1000 mit LB-Chloramphenicol-Medium verdünnt, lag sie unter $OD_{600}$=0,5, wurde 1:100 verdünnt. Von den Verdünnungen wurden 10-20µl auf LB-Agarplatten mit Chloramphenicol (Konzentration 34µg/ml) und 1% Arabinose ausplattiert. Diese Platten wurden über Nacht bei 32°C inkubiert.

Um kontrollieren zu können, ob die Bakterien die Kanamycin-Kassette tatsächlich verloren hatten, wurden am Folgetag Replika-Platten gepickt. Dazu wurden pro Klon je 3 über Nacht gewachsene Kolonien jeweils auf einen LB-Agar mit Chloramphenicol (34µg/ml) und Kanamycin (50µg/ml) und auf einen Agar mit Chloramphenicol (34µg/ml) und 1% Arabinose überführt. Wieder wurden alle Platten bei 32°C über Nacht inkubiert. Am Folgetag konnte nun zwischen Klonen mit Kanamycin-Kassette und ohne differenziert werden. Die Klone ohne Kanamycin-Genkassette konnten auf dem Kanamycin-haltigen Agar nicht wachsen und bildeten ausschließlich auf dem Chlorampenicol-haltigen Agar Kolonien. Diese Klone wurden ausgewählt und in 3ml LB-Medium mit Chloramphenicol (Konzentration 34µg/ml) als Übernachtkulturen angeimpft. Ziel war es, die BAC-DNA auf Entfernung der Kanamycin-Kassette nochmals durch PCR zu überprüfen. BAC-DNA wurde davor wieder durch BAC-Minipräparation isoliert (siehe BAC-Minipräparation). Die Produkte der Kontroll-PCR wurden mit Hilfe von Gelelektrophorese aufgetrennt und ihr Bandenmuster kontrolliert. Dabei zeigten die Klone 1_2, Klon 2_7 und Klon 2_8 das gewünschte Muster.

#### 2.2.2.5 Sequenzierung

Die Gensequenz der ausgewählten Bakterienklone wurde durch Sequenzierung auf die gewünschte Mutation überprüft. Dafür wurden die Produkte der letzten Kontroll-PCR mit dem Gel-Extraction-Kit (HiYield® PCR Clean-up/ Gel Extraktion- Kit) nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Danach wurde eine Kontroll-Gel-Elektrophorese durchgeführt. Für die Sequenzierung (LGC Genomics Berlin) wurden je 10µl DNA (Konzentration ca. 12ng/µl) mit 2µl Primer (#38, siehe Material, 1:10 Verdünnung) und 2µl PCR-Wasser pro Ansatz zusammengeführt.

#### 2.2.2.6 Anlegen von Glycerinkulturen

Von dem Bakterienklon mit korrekter Mutation Klon 1_2, bestätigt durch Sequenzierung, wurde eine Glycerinkultur angelegt. Dazu wurde der Klon in 1ml LB-Medium und Chloramphenicol (34µg/ml) angeimpft und über Nacht bei 32°C inkubiert. Am Folgetag wurden 900µl von der Bakteriensuspension mit derselben Menge Einfriermedium für Glycerinkulturen gemischt und in einem Kryoröhrchen (2ml) bei -80°C eingefroren.

#### 2.2.2.7 BAC-Midipräparation: Isolierung der BAC-DNA

Die Aufreinigung größerer Mengen von BAC-DNA erfolgte mit Hilfe des NucleoBond®Xtra Midi-Kit (Machery-Nagel). Zuerst wurde über Nacht eine Bakterienkultur in 200ml 2xYT-Medium mit Chloramphenicol (Endkonzentration 34µg/ml) angelegt. Die Inkubation erfolgte erneut bei 32°C. Danach wurden die Bakterien abzentrifugiert (5000UpM, 4°C, 10min). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet nach den Angaben des Herstellerprotokolls resuspendiert. Das Protokoll wurde in veränderter Form verwendet, weswegen nur die Änderungen hier aufgeführt werden. Der Resuspensionspuffer (15ml) wurde vor der Verwendung bereits mit RNAse (Endkonzentration 100µg/ml) gemischt. Es wurden jeweils 15ml des Lysepuffers, Neutralisationspuffers und Resuspensionspuffers verwendet. Auf die Zugabe des Neutralisationspuffers folgte anschließend die Inkubation auf Eis für 15min. Während der Inkubationszeit wurde das Gemisch alle 5min invertiert. Danach wurde erneut zentrifugiert (5500UpM, 4°C, 15min). Die im Protokoll für den ersten Waschschritt benötigten Säulenfilter (Bestandteil des Kits) wurden nicht verwendet. Stattdessen wurde der Überstand nach der Zentrifugation mit Hilfe einer 3-fach gefalteten Mullbinde gefiltert und auf die zuvor bereits equilibrierte Säule gegeben. Das Protokoll wurde ab dem 2. Waschschritt wieder verfolgt. Der Elutionspuffer (5ml) wurde auf 65°C vorgewärmt und dann in 1ml Schritten auf die Säule gegeben. Im Anschluss an die Fällung der BAC-DNA mit 3,5ml Isopropanol (siehe Protokoll) folgte eine 60minütige Zentrifugation (5500UpM, 4°C). Auch nach der Zugabe von Ethanol wurde erneut für 15min zentrifugiert (5500UpM, 4°C). Das erhaltene Pellet wurde getrocknet und in 200µlTE-Puffer (siehe Protokoll) gelöst,

dazu wurden die DNA im TE-Puffer für 60min bei 36°C geschüttelt. Die gelöste DNA wurde ab diesem Zeitpunkt, in 50µl Aliquots, bei 4°C aufbewahrt.

### 2.2.3 Zellbiologische Methoden

#### 2.2.3.1 Kultivierung von Zellen

Die verschiedenen verwendeten Zellen wurden in verschiedenen Zellkulturflaschen (T25 und T75) im Brutschrank kultiviert (37°C, 5%$CO_2$). Das zellspezifische Medium wurde während der Wachstumsphasen jeden dritten Tag ausgewechselt und davor auf 37°C vorgewärmt. Zum Passagieren wurde das Medium entfernt (T25 mit 8ml, T75 mit 15ml), die Zellen wurden dreimal mit 3ml (T25) oder 5ml (T75) PBS/EDTA (0,01mM/2%) gewaschen und für fünf Minuten, bei 37°C, mit Trypsin (2ml für T25 und 4ml für T75) versetzt. Das Trypsin wurde stets bei 4°C gelagert um die enzymatische Aktivität zu erhalten. Die abgelösten Zellen wurden wieder in Medium aufgenommen. Für das Passagieren wurden die Zellen aus einer Kulturflasche, je nach Zelltyp, auf die neuen Zellkulturflaschen verteilt und mit Medium versetzt. HFF wurden im Verhältnis 1:2, MRC-5 im Verhältnis 1:3 gesplittet.

Um die Zellen für geplante Experimente auszusäen, wurde die Zellzahl aus den in Medium aufgenommenen Zellen bestimmt. Dazu wurde die Neubauer Zählkammer genutzt. Dabei wurde der Mittelwert aller 4 ausgezählten Quadranten bestimmt und es konnte somit die Zellzahl/ml Medium errechnet werden. Daraus konnte, unter Berücksichtigung der gewünschten Zelldichte, die benötigte Verdünnung rechnerisch ermittelt werden. Die Zellen wurden dementsprechend mit Medium verdünnt und konfluent ausgesät (siehe Tabelle 6).

**Tabelle 6 Zellzahlen**

| Zellart | wells/Platte | Zellzahl/well |
|---|---|---|
| HFF | 96 well | $1{,}7x10^4$ |
| | 24 well | $2{,}5x10^4$ |
| | 12 well | $1{,}5x10^5$ |
| | 8 well (IBIDI/ Mikroskopierkammer) | $2{,}5x10^4$ |
| MRC-5 | T25 Kulturflasche | $5x10^5$ |
| | T75 Kulturflasche | $1{,}5x10^6$ |

#### 2.2.3.2 Infektion eukaryotischer Zellen

Für die Infektion wurden die Zellen bereits am Vortag in den Zellkulturplatten oder IBIDIs ausgesät (Zellzahl siehe Tabelle 6). Am Tag der Infektion wurden diese unter dem Lichtmikroskop auf Konfluenz und gewünschte Zelldichte (80-90%) kontrolliert. Die berechnete Virusmenge für die Infektion, die MOI (*multiplicity of infection)*, variiert je nach Experiment (siehe Tabelle 7), wurde dem entsprechenden Virusstock entnommen und je nach Bedarf mit Medium verdünnt. Die Verdünnung wurde 4-24h auf den Zellen belassen. Anschließend wurde zum Beenden der Infektion das virushaltige Medium abgenommen, die Zellen wurden mit PBS (0,01mM) gewaschen und neues Medium hinzugegeben. Durch das Waschen sollten an den Zellen und an der Platte haftende Viruspartikel entfernt werden. Die infizierten Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt.

**Tabelle 7 MOI (Multiplicity of infection) für die verschiedenen Experimente**

| **Viren** | **Experiment** | **MOI** |
|---|---|---|
| TB40-BAC4, TBUL48-DelC80, TBUL48-DelC80rev, TBUL48-5LtoA | Focus-Expansion-Assay | 0,06 |
| TB40-BAC4, TBUL48-DelC80, TBUL48-DelC80rev, TBUL48-5LtoA | High-MOI-Wachstumskinetik | 1 |
| TB40-BAC4, TBUL48-DelC80, TBUL48-DelC80rev, TBUL48-5LtoA | Low-MOI-Wachstumskinetik | 0,05-0,06 |
| TB40-BAC4, TBUL48-DelC80, TBUL48-DelC80rev, TBUL48-5LtoA | Westernblot | 3 |
| TB40-BAC4, TBUL48-DelC80, TBUL48-DelC80rev, TBUL48-5LtoA | Immunfluoreszenzmikroskopie | 0,5 |
| TB40-BAC4, TBUL48-DelC80, TBUL48-DelC80rev, TBUL48-5LtoA | Elektronenmikroskopie | 1 |

| | | |
|---|---|---|
| TB40-BAC4,<br>TBUL48-DelC80,<br>TBUL48-5LtoA,<br>TBUL48-DelC28 | Focus-Expansion-Assay | 0,06 |
| TB40-BAC4,<br>TBUL48-DelC80,<br>TBUL48-5LtoA,<br>TBUL48-DelC28 | Low-MOI-Wachstumskinetik | 0,045 |
| TB40-BAC4,<br>TBUL48-DelC80,<br>TBUL48-5LtoA,<br>TBUL48-DelC28 | Immunfluoreszenzmikroskopie | 0,5 |

#### 2.2.3.3 Hemmung des nukleären Exports mit Leptomycin B

Sollte der nukleäre Export in den Zellen gehemmt werden (siehe Immunfluoreszenzexperimente), wurden die infizierten Zellen vier Stunden vor der Fixierung mit Leptomycin B (LMB) behandelt. Davor wurden die Zellen bereits für 30min mit Cycloheximid in MEM (Endkonzentration 50µg/ml) versetzt um die de novo Proteinsynthese zu hemmen. Das Cycloheximid-Medium-Gemisch wurde abgenommen und durch LMB (10ng/ml) in Cycloheximid- haltigem Medium ersetzt. Als Kontrolle wurde zu einigen wells erneut frisches Cycloheximid-Medium, ohne LMB, gegeben. Nach vier Stunden wurde das jeweilige Gemisch entfernt und die Zellen wurden fixiert (siehe Immunfluoreszenz).

#### 2.2.3.4 Titerbestimmung eines Virusstocks

Die Titerbestimmung wurde unter Verwendung von HFF-Zellen durchgeführt. Diese wurden am Vortag konfluent auf 96 well-/ 24-well- Platten ausgesät (Zellzahl siehe Tabelle 6). Der fragliche Virusstock wurde stets bei -80°C aufbewahrt. Er wurde zuerst bei RT aufgetaut und im Anschluss in Zehnerreihen verdünnt. Dazu wurden je 100µl der vorherigen Verdünnungsstufe mit 900µl MEM gemischt (Verhältnis

1:10). Das Mischen erfolgte durch vorsichtiges, mehrmaliges Auf- und Abpipettieren. Es wurden Verdünnungsstufen von unverdünnt bis $10^{-6}$ angefertigt. Von jeder Verdünnungsreihe wurden 100µl zu den Zellen gegeben. Um die Genauigkeit zu erhöhen, wurde immer ein Dreifachansatz angefertigt. Nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen fixiert. Dazu wurde das Medium vorsichtig abgenommen und kaltes Methanol (-20°C) für zehn Minuten auf die Platte gegeben. Für die 96-well-Platte wurden 100µl und für die 48-well-Platte 200µl verwendet. Die Platten wurden während der Inkubationszeit zusätzlich bei -20°C gelagert. Anschließend wurden die Zellen bei RT getrocknet und drei Mal mit PBS (0,01mM) gewaschen. Es folgte die Färbung auf das immediate early Antigen von HCMV. Dazu wurde die Immunperoxidasefärbung genutzt. Es wurden 50µl (96-well) oder 100µl (48-well) unverdünnter IE-Primärantikörper (Hybridome 63-27) für 30 Minuten auf die Zellen gegeben. Im Anschluss wurde dreimal mit PBS (0,01M) gewaschen. Es folgte der Sekundärantikörper (HRP-gekoppelt) mit einer 1:100 Verdünnung in PBS/1%BSA. Die Inkubationszeit betrug mindestens 45 Minuten bei RT, danach wurde erneut drei Mal mit PBS (0,01M) gewaschen. Für die Peroxidasefärbung wurde die AEC-Lösung (3-amino-9-ethylcarbazole-Lösung) nach Protokoll (siehe Material) für jeden Versuch frisch hergestellt. Auf die 96-well Platten wurden jeweils 50µl, auf die 48-well-Platten jeweils 100µl/well davon pipettiert. Nach ca. 20 Minuten bei RT wurde die Lösung abgegossen und die Platten wurden erneut zwei Mal mit PBS (0,01M) gewaschen. Zum Schluss konnten die rot angefärbten Zellkerne mit dem Lichtmikroskop ausgezählt werden. Der Titer des Virusstocks, in *plaque forming units*/ml (PFU/ml), wurde nach folgendem Prinzip ermittelt:

$$\frac{\text{gezählte Zellzahl x Verdünnungsstufe}}{\text{eingesetztes Volumen (ml) bei Infektion}}$$

#### 2.2.3.5 Virusrekonstitution mittels Elektroporation

Die Rekonstitution der verwendeten Mutantenviren musste, auf Grund ihres Wachstumsdefekts, unter komplementierenden Bedingungen erfolgen. Dazu wurde die DNA für ein vollständiges, korrektes pUL48, in Form eines Plasmids (#1536), mittels Elektroporation in MRC-5-Zellen eingebracht. Diese sollten am Tag der Elektroporation unter dem Lichtmikroskop eine optimale Zelldichte von 80-90% zeigen. Für eine Elektroporation wurden ca. $3x10^6$ Zellen benötigt. Zu Beginn wurden die Zellen durch Trypsinieren von der Zellkulturflasche gelöst und gemeinsam in acht ml Medium in einem 50ml Falcon aufgenommen. Das Falcon wurde anschließend mit sterilem PBS (0,01M) auf 50ml aufgefüllt und fünf Minuten bei 800UpM und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig vom entstandenen Zellpellet abgesogen und die Zellen mit je 350µl Opti-MEM (pro geplanter Elektroporation) durch Schwenken resuspendiert. Die Resuspension wurde mit besonderer Vorsicht durchgeführt, um die Zellen möglichst wenig mechanischem Stress auszusetzen und so die Zelltodrate zu verringern. Die T25 zur späteren Aufnahme der elektroporierten Zellen wurden bereits vorbereitet und mit acht ml Medium befüllt. Die Vorbereitung sollte das zügige Arbeiten während der Elektroporation ermöglichen, um die Effizienz zu optimieren. Für eine Elektroporation wurden 6µg des komplementierenden Plasmids (in 50µl Opti-MEM) zu den Zellen gegeben. Die nächsten Schritte geschahen möglichst rasch hintereinander um den Zelltod möglichst gering zu halten. Das Gemisch aus Zellen und DNA, insgesamt 400µl, wurde in die 4mm Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation fand bei 260V, 1050µF und ∞ Widerstand statt. Das Gemisch wurde mit der beigelegten Pipette aus der Küvette abgezogen (dabei wurde der Schaum mit dem enthaltenen Zellschrot in der Küvette belassen) und in die vorbereiteten T25 Kulturflaschen überführt. Die Aufbewahrung erfolgte im Brutschrank bei 37°C. Am Folgetag wurden unter dem Mikroskop die Dichte der adhärenten Zellen beurteilt und falls nötig erneut elektroporierte Zellen zugesät, um das Überleben der Zellen durch mehr Zell-zu-Zell-Kontakte zu fördern. Außerdem wurde das Medium gewechselt um das Wachstum nicht durch Zellschrot zu beeinträchtigen. Die komplementientierten Zellen konnten nun mit den Mutantenviren infiziert werden. Nach ca. sieben bis zehn Tagen konnte Plaquebildung (Abkugeln benachbarter Zellen) beobachtet werden. Sobald die Plaques eine gewisse Größe erreichten, wurden die Zellen durch Trypsinieren

gelöst und auf zwei T25 Flaschen aufgeteilt. Hier wurden dann zu jeder Flasche MRC-5 mit dem komplementierenden Plasmid zugesät. Das nun in den Zellen extra exprimierte pUL48 konnte die mutationsbedingten Defizite des Virus ausgleichen, was auch zu einer Freisetzung infektiöser Viruspartikel der gewünschten Virusmutante in den Zellkulturüberstand führte. Ohne die Anwesenheit des komplementierenden Plasmids war eine Freisetzung von Viruspartikeln der Virusmutante nicht möglich.

Die Rekonstitution der Virusmutanten TBUL48-DelC80 und TBUL48-5LtoA konnte durch Infektion dieser Zellen mit dem enthaltenen komplementierenden Plasmid erfolgen, denn es lagen für beide Mutanten zu Beginn bereits wenige infizierte Zellen vor. Die Rekonstitution erfolgte nun durchgehend durch Co-Kultur mit komplementierten Zellen.

Die Rekonstitution der Mutante TBUL48-DelC28 geschah ebenfalls durch Elektroporation. Dafür wurden pro Elektroporation ca. $5x10^6$ MRC-5-Zellen, in 300µl Opti MEM benötigt. Es wurden 2µl der BAC-DNA des Klons 1_2 (Konzentration ca. 0,198µg/µl) mit 1µg des komplementierenden Plasmids #1536 (Konzentration 6,2µg /µl) gemischt. Dies geschah in jeweils 50µl Opti MEM pro Elektroporation. Das Pipettieren der BAC-DNA erfolgte erneut mit abgeschnittenen Pipettenspitzen. Die Elektroporation der Zellen mit dem DNA-Gemisch erfolgte in einer 4mm Elektroporationsküvette und einem Gesamtvolumen von 350µl, bei 260V, 1050µF und ∞ Ohm. Die weitere Rekonstitution erfolgte unter komplementierenden Bedingungen (siehe TBUL48-DelC80 und TBUL49-5LtoA). Der erreichte Endtiter betrug nach 4 Wochen $1,4 \cdot 10^3$ PFU/ml.

Die Rekonstitution der Revertante TBUL48-DelC80rev erfolgte durch Elektroporation. Dazu wurden erneut ca. $3x10^6$ MRC-5 Zellen pro Elektroporation benötigt. Es wurden ca. 2µg BAC-DNA der TBUL48-DelC80-Mutante zusammen mit 1µg des Transferkonstrukts (PCR-Produkt) zusammengeführt und in einem Volumen von maximal 40µl in Opti MEM gemischt. Dieses Gemisch wurde für 3 Stunden auf Eis inkubiert, damit sich homologe Sequenzen finden konnten. Anschließend wurden die MRC-5 in einem Volumen von 300µl mit der DNA elektroporiert. Die Elektroporation wurde bei 260V, 1050µF und einem Widerstand von ∞ in einer 4mm Elektroporationsküvette durchgeführt. Nach 24h wurde das

Medium gewechselt und die erste visuelle Kontrolle durchgeführt. Die erfolgreiche Rekombination konnte durch Plaquebildung nach vier Tagen bestätigt werden. In diesem Fall war keine Co-Kultur mit komplementierten Zellen notwendig, da die Revertante dem Wildtyp entspricht und somit kein Wachstumsdefizit aufweist.

Um einen Virusstock der Revertante zu erhalten, wurde eine Plaquereinigung durch „Plaque picking“ durchgeführt. Mit den, 7 Tage nach Elektroporation, generierten Überständen wurden frische HFF (12-well-Platten, Zellzahl siehe Tabelle 6) mit 100µl Virusüberstand pro well infiziert. Die Infektion wurde nach 4h beendet und das Medium (MEM 3ml) gewechselt. Medienwechsel geschah jeden 3. Tag. Die Zellen wurden jeden Tag lichtmikroskopisch kontrolliert und 3 sich entwickelnde Plaques am 5. Tag nach Infektion ausgewählt und mit Hilfe einer 200µl Pipette auf eine frische 12-well-Platte mit HFF überführt (Plaque picking). Das Medium auf den Platten wurde jeden 3. Tag gewechselt. Die entstehenden Plaques wurden 10 Tage später durch Trypsinieren von der Platte gelöst und in T25 Kulturflaschen mit jeweils ca. $5x10^5$ HFF überführt. Diese wurden bis zur visuellen Vollinfektion (Infektion aller Zellen der Kulturflasche) nach 13 Tagen weitergeführt. Die Überstände aller 3 Flaschen (je eine Flasche pro gepicktem Plaque) wurden dann geerntet und in 1ml Tubes bei -80°C zur Lagerung eingefroren. Mit den Überständen wurde ein IBIDI infiziert (100µl, nicht titrierter Überstand) und am 5. Tag nach Infektion eine Immunfluoreszenz durchgeführt. Mit den Überständen wurden frische HFF infiziert und die Zellen am 5. Tag nach der Infektion geerntet. Die Zellpellets wurden in 200µl PBS resuspendiert und nach Protokoll des Herstellers mit dem High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche), eine DNA-Extraktion durchgeführt. Diese DNA wurde mittels PCR (siehe Polymerase-Kettenreaktion) amplifiziert und zur Sequenzierung (LGC Genomics Berlin) geschickt. Der Klon mit dem Namen PCR_1 enthielt die gewünschte Sequenz und wurde weiter kultiviert. Es wurden neue T75-Kulturflaschen mit HFF (100% konfluent) genutzt. Für deren Infektion wurde bis zu 1ml des generierten Überstands verwendet. Nach 5 Tagen wurde ein Überstand mit dem Titer $9,5x10^6$ PFU/ml generiert (Für Titration siehe Titerbestimmung eines Virusstocks).

#### 2.2.3.6 Wachstumskinetik

Die Wachstumskinetik kann vergleichende Aussagen über das Wachstumsverhalten verschiedener Viren liefern. Insbesondere ist die Quantifizierung freigesetzter, infektiöser Viruspartikel zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion möglich. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Kinetiken durchgeführt: die High- MOI-Wachstumskinetik und die Low-MOI-Wachstumskinetik. Der Unterschied lag in der zu Beginn des Experiments eingesetzten Virusmenge. Für die High-MOI-Wachstumskinetik der TBUL48-5LtoA-Mutante wurde eine MOI von 1 für alle Viren und für die Low-MOI-Wachstumskinetik eine MOI von 0,05 -0,06 für alle verwendeten Viren eingesetzt. Dabei lag die MOI des Wildtypvirus und der Revertante bei der Low-MOI-Kinetik niedriger als die der Mutantenviren. In der Low-MOI-Wachstumskinetik mit der TBUL48-DelC28-Mutante wurde jeweils eine MOI von ca. 0,045 für jedes Virus angestrebt. Die High-MOI-Wachstumskinetik war auf 7 Tage begrenzt und es wurde jeden Tag Überstand entnommen und auf infektiöse Virionen kontrolliert. Die Low-MOI-Wachstumskinetik musste an Tag 18 beendet werden, da es hier zu starkem Zelltod kam. Dabei wurde der Überstand alle drei Tage geerntet.

Für alle Wachstumskinetiken wurden HFF verwendet. Diese wurden am Vortag, wie unter Infektion eukaryotischer Zellen beschrieben, in 48-well-Platten (Zellzahl siehe Tabelle 6) ausgesät. Am Folgetag erfolgte die Infektion mit der gewünschten MOI (siehe Tabelle 7) für vier Stunden. Danach wurde das virushaltige Medium entfernt, die Zellen mit vorgewärmtem PBS gewaschen und frisches Medium zu den Zellen gegeben. Die einzelnen Viren wurden auf den Platten durch große Abstände räumlich getrennt. Für jedes Virus wurden dabei eigenes Medium sowie neue Pipetten und dazugehörige Spitzen verwendet, um Kontaminationen zu vermeiden. Die Platten wurden im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Die Überstände wurden für die High-MOI-Wachstumskinetik jeden zweiten Tag bis Tag 7 und für die Low-MOI-Wachstumskinetik jeden 3. Tag bis einschließlich Tag 18 geerntet. Die Ernte erfolgte durch vorsichtige manuelle Abnahme des Überstands. Sofort danach wurden 500µl neues vorgewärmtes Zellmedium zu den Zellen gegeben. In dieser Arbeit entschieden wir uns für eine direkte Weiterverwertung der Überstände, ohne Lagerung bei -80°C. Das Ziel dieses

Vorgehens war es, eine möglichst genaue Vorstellung über die Anzahl der im Überstand enthaltenen Viruspartikel zu bekommen, ohne den möglichen Verlust durch Einfrieren und Lagern. Dementsprechend wurden die Überstände direkt titriert (Vorgehen siehe Titerbestimmung eines Virusstocks) und die Verdünnungsstufen im Dreifachansatz sofort auf neue 48-well-Platten mit bereits ausgesäten HFF gegeben. Diese wurden wie in Titerbestimmung eines Virusstocks beschrieben auf das IE-Antigen gefärbt und ausgezählt. Aus den Ergebnissen entstanden nach Abschluss des Experiments Wachstumskurven, in denen die Virustiter der Mutanten und des Wildtyps miteinander verglichen werden konnten. Zur Sicherung der Ergebnisse wurde jede Kinetik mindestens drei Mal unabhängig voneinander durchgeführt und für die Ergebnisse der Mittelwert berechnet.

#### 2.2.3.7 Focus-Expansion-Assay

Mit dem Focus-Expansion Assay kann die direkte Zell-zu Zell-Ausbreitung eines Virus, ohne den Effekt freigesetzter infektiöser Partikel, analysiert werden. Dazu wurden erneut HFF verwendet. Diese wurden am Vortag in 12-well-Platten ausgesät (Zellzahl siehe Tabelle 6). Die Anzahl infizierter HFF zu Beginn des Experiments sollte ca. 200 betragen. Die benötigten Virusmengen dafür wurden in Vorexperimenten bestimmt und die MOI lag ca. bei 0,0006. Für die Infektion wurden die benötigten Verdünnungsstufen hergestellt und Zellen mit der ermittelten Virusmenge infiziert. Die Infektion wurde nach 24h beendet und das virushaltige Medium durch 1ml Gamunex-Medium-Mischung (1:20) ersetzt (Endkonzentration 5mg Protein, davon mindestens 98%IgG). Das Gamunex sollte die freigesetzten Virionen binden und neutralisieren, damit das Ergebnis ausschließlich auf direkte Zell-zu Zell-Ausbreitung zurück zu führen war. Das Gamunex-haltige Medium wurde jeden 3. Tag gewechselt um die Proteolyse der enthaltenen Antikörper zu vermeiden. Das Experiment wurde am 7. bzw. am 15. Tag nach der Infektion beendet. Dazu wurde das Medium abgenommen und die Zellen wurden mit kaltem Methanol fixiert (Vorgehen siehe Titerbestimmung eines Virusstocks). Die Färbung auf das IE-Antigen sollte mit dem Immunfluoreszenzmikroskop ausgewertet werden. Dazu wurde als Primärantikörper der CMV-Antikörper von DAKO verwendet. Als Sekundärantikörper wurde der Anti-Maus Alexa 488 Antikörper genutzt. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (genaues Vorgehen siehe

Immunfluoreszenz). Zur Auswertung wurden je nach Versuch 20-50 Plaques pro Virus durch das konfokale Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Die Auswahl erfolgte randomisiert mit derselben Anzahl aus jedem Quadranten. Es wurde die absolute Zellzahl pro Fokus/Virusplaque ausgezählt. Die graphische Darstellung erfolgte mit dem Programm Graphpad Prism. In den Abbildungen wurden die Daten pro Virus als Punktwolke dargestellt und der Mittelwert mit Standardabweichung bestimmt.

#### 2.2.3.8 Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Immunfluoreszenzmikroskopie diente der Untersuchung intrazellulärer Lokalisation viraler Proteine. Dazu wurden die HFF-Zellen am Vortag in acht-Kammer IBIDIs ausgesät (Zellzahl siehe Tabelle 6). Die Infektion erfolgte meist mit einer MOI von ca. 0,5. Das virushaltige Medium wurde nach vier Stunden vorsichtig mit der Pipette abgenommen und die Zellen einmal mit 200µl vorgewärmtem PBS gewaschen. Im Anschluss wurden jeweils 250µl frisches Nährmedium hinzugegeben und die Zellen im Brutschrank für fünf Tage inkubiert. Am dritten Tag wurde ein Medienwechsel durchgeführt um optimale Bedingungen für die Zellen zu schaffen. Am fünften Tag wurde das Experiment beendet und die Zellen wurden fixiert. Dabei wurde zuerst das Medium abgenommen und anschließend zwei Mal mit 200µl PBS (0,01M) gewaschen. Die Fixierung erfolgte mit Paraformaldehyd (PFA 4%) für zehn Minuten bei vier Grad. Diese Methode erhält die Zellstruktur bestmöglich. Nach Abnahme des PFA folgte die fünfminütige Permeabilisierung mit 200µl TritonX-100 (0,1%) in PBS. Dabei wurde die Platte geschwenkt. Der folgende Waschschritt beinhaltete zweimaliges Waschen mit PBS. Als nächstes wurden je 200µl Blocking-Puffer (pro Kammer) für 30 Minuten zu den Zellen gegeben. Durch das enthaltene Humanserum sollten unspezifische Antiköperbindestellen geblockt werden. Auch während dieser Inkubationszeit wurde die Platte konstant geschwenkt. Danach wurde der gewünschte Primärantikörper in Blocking-Puffer verdünnt (Verdünnung siehe Material, Antikörper) und auf die Zellen pipettiert. Die Inkubationszeit betrug 45 Minuten und geschah unter dauerhaftem Schwenken, um die Verteilung zu verbessern. Es folgten die Abnahme des Antikörpers und ein weiterer Waschschritt mit Waschpuffer. Als Sekundärantikörper wurden nun die Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper verwendet. Diese wurden nach Angaben des

Herstellers 1:1000 mit dem Blocking-Puffer verdünnt. Davon wurden je 200µl auf die Zellen gegeben und diese wieder 45 Minuten unter Schwenken inkubiert. Auch nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde erneut drei Mal mit dem Waschpuffer gewaschen. Zum Schluss erfolgte die Färbung des Zellkerns mit DAPI (1mg/ml) in PBS mit der Verdünnung 1:1000. Nach zehnminütiger Inkubation bei RT wurde zwei Mal mit PBS gewaschen und pro Zellkammer final 200µl PBS hinzugefügt. Die Lagerung der gefärbten IBIDIs erfolgte stets bei 4°C und in Aluminiumfolie eingepackt, um das Ausbleichen des fluoreszierenden Signals zu verhindern. Die Präparate wurden mit dem Fluoreszenz-Mikroskop (Axio-Observer.Z1 von Zeiss) betrachtet und ausgewertet. Die verwendete Software war Axiovision 4.8.

### 2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

#### 2.2.4.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulphate-Polyacrylamidgelelektrophorese*) trennt Proteine der Größe nach auf. Die dafür benötigten Zellproben auf 48-well Platten wurden mit je 50µl Ripa-Puffer für 5min bei 4°C lysiert, mit der Pipette von der Platte geschabt und bei -80°C gelagert. Alle benötigten Zelllysate wurden gleichzeitig aufgetaut und mit 4x SDS-Ladepuffer versetzt (pro 50µl Lysat 12,5µl Ladepuffer). Anschließend wurden die Proben bei 95°C erhitzt und für eine Minute mit Ultraschall (Stufe 7) behandelt. Die Ultraschallbehandlung zerstört genomische DNA. Das Erhitzen in Gegenwart von SDS-Ladepuffer dient der Denaturierung und gleichmäßigen Beladung der Proteine mit SDS. Es folgte noch Zentrifugation für eine Minute bei 13000UpM. Danach wurden die Proben auf Eis gelagert oder bei -20°C aufbewahrt.

Die SDS-Gele bestanden aus einem Sammelgel (4%) und einem Trenngel mit 7,5% (Angaben für große Proteine wie pUL48, genaue Zusammensetzung siehe Material). Die 1mm dicken Gele wurden meist direkt vor der Elektrophorese selbst gegossen. Nach 40minütiger Polymerisationszeit konnten die Gele in die Laufapparatur eingespannt werden. Die kalkulierte Probenmenge und 5µl des Markers (Page ruler plus prestained, Thermo Scientific) konnten dann in die Taschen geladen werden. Die Elektrophorese erfolgte für 15min bei 100v und

anschließend für 45min bei 200V in 1x Lämmli Puffer und wurde beendet, sobald die blaue Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte.

### 2.2.4.2 Western Blot (Nassblot)

Der Western Blot überträgt die mit SDS-PAGE aufgetrennten Proteine durch das Nassblot-Verfahren auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid-Membran). Proteine auf diesen Membranen können in folgenden Schritten mit Hilfe von Antikörpern detektiert werden. Für den Nassblot-Transfer wurde der Aufbau gemäß Abbildung 8 verwendet.

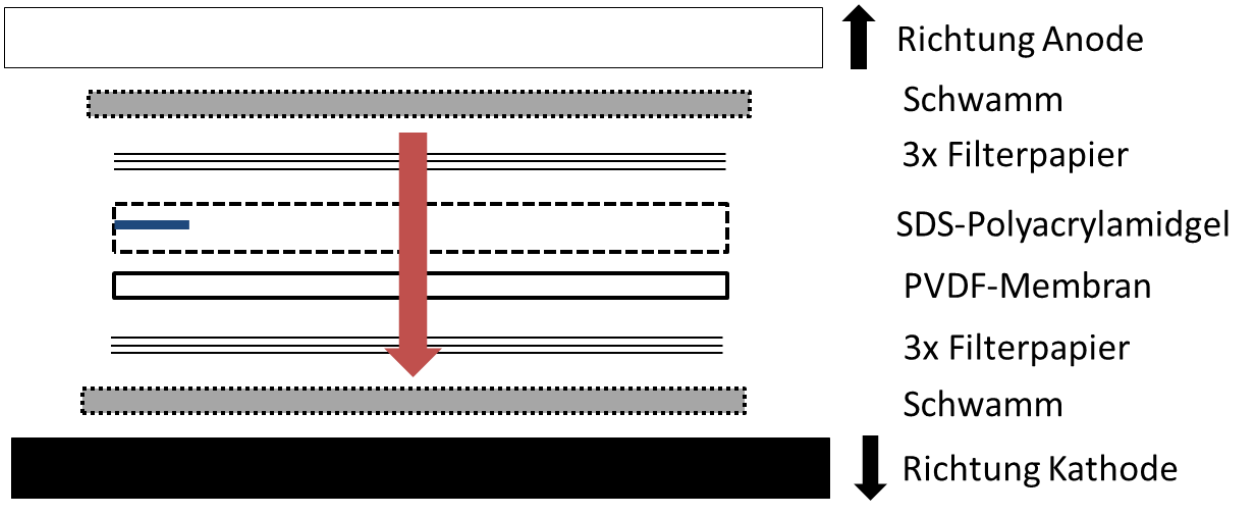



**Abbildung 8 Aufbau des Blotting-Systems**

Die Abbildung zeigt den schematischen Aufbau der Blotting-Apparatur für den Westernblot. In der Mitte das SDS-Polyacrylamidgel (Sodium dodecyl Sulfat) mit dem Marker (blaue Bande). Darüber die Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF -gestrichelter Rand), Das Filterpapier und die verwendeten Schwämme (gepunkteter Rand). Die Wände der Apparatur sind in schwarz und weiß dargestellt. Der rote Pfeil zeigt die Richtung des Blottens auf die PVDF-Membran.

Das Gel aus der SDS-PAGE enthielt nun die aufgetrennten Proteine und wurde vor dem Transfer vorsichtig vom Sammelgel separiert. Die PVDF-Membran wurde vor dem Transfer zuvor für zwei Minuten mit Methanol aktiviert. Nach dem Zusammenbau der Bestandteile in der richtigen Reihenfolge wurde die Kassette mit der schwarzen Wand Richtung Kathode in die Apparatur eingefügt und die Transferkammer mit Transferpuffer aufgefüllt. Der Transfer fand bei 0,3A in

Nassblot-Transferpuffer auf Eis statt. Wegen der enormen Größe des gewünschten Proteins pUL48 erfolgte der Transfer für 120min bei 50V.

Nach dem erfolgreichen Transfer wurde das Gel von der Membran entfernt und die PVDF-Membran kurz in Aqua Bidest geschwenkt. Danach wurde sie zur Inaktivierung für 15 Sekunden in Methanol gelegt und auf einem Whatman-Papier bei RT getrocknet. Dieser Schritt sollte die Fixierung der Proteine auf der Membran verstärken. Zur erneuten Aktivierung wurde wieder Methanol eingesetzt und die Membran im Anschluss in PBS mit Tween20 (0,3%) geschwenkt. Nun folgte die Detektion der gesuchten Proteine mit Hilfe von Antikörpern. Zuerst wurde die aktivierte Membran aber in einer Blocking-Lösung (PDST und 0,5% Magermilchpulver) inkubiert, um unspezifische Antikörperbindung zu vermeiden. Vor Zugabe des ersten Primärantikörpers wurde noch einmal mit PBST gewaschen. Der Primärantikörper wurde mit einer Mischung aus Blocking-Puffer (10%) und PBST nach Bedarf verdünnt (siehe Material Antikörper) und die Membran wahlweise entweder für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C darin geschwenkt. Dazu wurde der Antikörper mit der Membran in eine Plastikhülle eingeschweißt. Nach abgelaufener Inkubationszeit folgten drei Waschschritte mit PBST für je 10 min, um nicht-gebundenen Antikörper zu entfernen. Für die Detektion von pUL48 war ein erneutes Inkubieren der Membran in Blocking-Puffer für ca. 30 Minuten notwendig. Im Anschluss wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper behandelt. Dies geschah für ca. eine Stunde bei RT. Es wurde ein HRP (horseradish peroxidase) -gekoppelter Antikörper mit einer Verdünnung von 1:10000 in Blocking-Puffer (10%) und PBST verwendet. Es folgten wieder dreimaliges Waschen, für je zehn Minuten mit PBST, und die finale Detektion. Für die Detektion wurde die Chemilumineszenz-Detektionslösung (Milipore) nach dem Protokoll des Herstellers genutzt. Die Detektion der Chemilumineszenzsignale geschah mittels FUSION-Detektionsgerät.

Danach konnte die Membran mit Methanol inaktiviert und trocken gelagert werden. Alternativ konnten die gebundenen Antikörper gelöst werden, um neue Proteine zu detektieren. Dazu wurde die PVDF-Membran für 20 Minuten bei 50°C in sog. Stripping-Puffer inkubiert. Dieser wurde in fünf Waschschritten sorgfältig entfernt. Jeder Waschschritt bestand aus zehnminütigem Schwenken der Membran in PBST.

Nach der Inkubation in Blocking-Puffer für 30 Minuten konnte nun wieder ein Primärantikörper auf die Membran gegeben werden.

### 2.2.5 Methoden zur ultrastrukturellen Analyse: Elektronenmikroskopie

Für die Elektronenmikroskopie wurden HFF in 8-well IBIDIs auf Saphirdisks ausgesät. Pro well wurden mindestens drei Disks platziert (Zellzahl pro well siehe Tabelle 6). Die Zellen wurden am nächsten Tag mit einer MOI von 0,5 infiziert. Die Infektion wurde nach zwei Stunden beendet, indem das virushaltige Medium abgenommen und pro well drei Mal mit 200µl vorgewärmtem PBS gewaschen wurde. Danach erfolgte die Zugabe von 250µl frischen Mediums (MEM). Das Medium wurde jeden dritten Tag gewechselt. Die Fixierung erfolgte am 5. Tag nach Infektion. Die Verarbeitung der Proben zur ultrastrukturellen Betrachtung erfolgte mit freundlicher Unterstützung von Clarissa Villinger (Virologie, Universitätsklinik Ulm). Es erfolgten Kryofixation durch *High-pressure-freezing*, Gefriersubstitution und Epon-Einbettung, für genaues Procedere siehe [115]. Die Auswertung wurde mittels Transelektronenmikroskopie (TEM, JEM-1400, Jeol, Tokyo, Japan) durchgeführt. Dieses Experiment wurde pro Virus dreimal durchgeführt.

### 2.2.6 Statistik

Die statistische und graphische Auswertung und Darstellung der Daten dieser Arbeit erfolgte mit Hilfe des Programms Graphpad Prism6.Es wurden der Mittelwert sowie die Standardabweichung verwendet.

# 3 Ergebnisse

## 3.1 Vorstellung der verwendeten Viren

Der erste Schritt der Arbeit bestand in der Generierung einer ausreichenden Menge an Virusmaterial, um Charakterisierungsexperimente durchführen zu können. In diesen Experimenten sollte die Virusmutante TBUL48-5LtoA auf ihr Wachstums-/ und Ausbreitungsverhalten sowie die Lokalisation des mutierten pUL48 untersucht werden. Zur Kontrolle dienten außer dem Wildtyp-HCMV eine Referenzmutante und ihre Revertante (Abbildung 9).

Als Wildtypvirus wurde das TB40-BAC4 Virus verwendet, von welchem sowohl die TBUL48-5LtoA Virusmutante wie auch alle anderen in dieser Arbeit verwendeten Virusmutanten abstammen [123]. Die Verwendung des TB40-BAC4 Virus erlaubt somit einen direkten Vergleich mit der zu charakterisierenden Viruspunktmutante und erleichtert die Beurteilung des durch die Mutationen möglicherweise veränderten Phänotyps von TBUL48-5LtoA. Als weiteres Referenzvirus wurde eine Virusmutante mit Deletion der C-terminalen 80 Aminosäuren von pUL48 (TBUL48-DelC80) verwendet. Laborinterne Vorexperimente mit dieser Virusmutante lieferten Hinweise für eine NES im C-Terminus des viralen Tegumentproteins pUL48 (nicht veröffentlichte Daten Jens von Einem). Um sicher zu stellen, dass die Ergebnisse für die TBUL48-DelC80 Virusmutante auch tatsächlich durch die Deletion zu erklären sind und nicht durch eventuell aufgetretene Nebeneffekte, sollte zusätzlich eine Revertante dieser Virusmutante generiert werden. Das allgemeine Prinzip hierfür bildet die Reinsertion des fehlenden C-terminalen Genomabschnittes durch Rekombination. Diese Revertante sollte sich wie das Wildtypvirus TB40-BAC4 verhalten und diente als weitere Referenz.

Die Virusmutante TBUL48-5LtoA enthielt insgesamt 5 Punktmutationen. Dabei wurden die hydrophoben Leucine an den Positionen 2213, 2215, 2218, 2220 und 2223 im C-Terminus des Proteins pUL48 durch Alanine ersetzt. Für diese Anordnung von Leucinen wurde durch Analysetools eine NES vorhergesagt (NetNES 1.1 Server zur Vorhersage). Die Mutation der Leucine sollte zu einem vollständigen Funktionsverlust der NES führen. Die TBUL48-5LtoA Mutante lag zu Beginn der Arbeit bereits in geringen Mengen vor und musste unter komplementierenden Bedingungen zunächst in Kultur genommen werden.

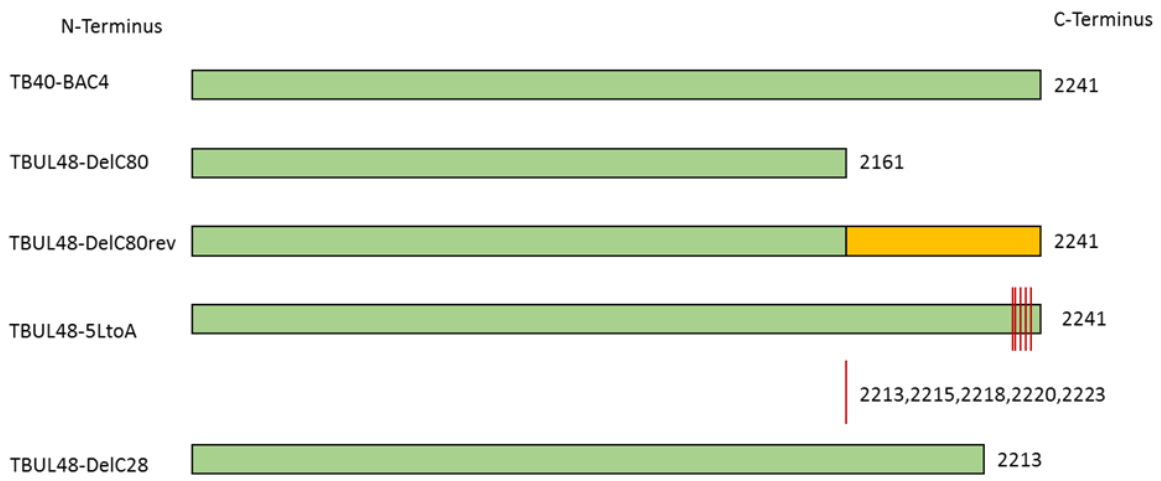



**Abbildung 9 Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz des pUL48 der verwendeten Viren**

Die Aminosäuresequenz von pUL48 der HCM-Virenstämme (Humanes Zytomegalie Virus) TB40-BAC4, TBUL48-DelC80, TBUL48-DelC80rev und TBUl48-5LtoA wird hier als Balken (grün) gezeigt (nicht maßstabsgetreu). N- und C-Terminus sind gekennzeichnet und jeweils die letzte C-terminale Aminosäure angegeben. Der gelbe Balken symbolisiert die reinserierte Sequenz in der Revertante. Die roten Striche stellen die Punktmutationen der TBUL48-5LtoA-Mutante dar.

## 3.2 Rekonstitution der Mutanten

Der erste Teil der Arbeit bestand aus der Generierung eines Virusstocks der beiden Virusmutanten, TBUL48-DelC80 und TBUL48-5LtoA. Dabei war es wichtig ausreichende Titer der Virusstocks für die Durchführung aller Experimente zu erhalten. Da für das TBUL48-DelC80 Virus ein Defekt bei der Bildung und Ausschleusung infektiöser Viruspartikel bekannt war und Vorexperimente dies auch für TBUL48-5LtoA vermuten ließen, musste das Wachstum dieser Virusmutanten komplementiert werden. Dies bedeutete konkret, dass die von den Virusmutanten infizierten Zellen ein fehlerhaftes pUL48 produzieren, wodurch die gesamte Virusmorphogenese gestört wird und keine infektiösen Partikel freigesetzt werden. Aus diesem Grund muss zusätzlich ein unverändertes pUL48 (WT-pUL48) in den Zellen exprimiert werden, damit ein vollständiger Replikationszyklus ablaufen kann und infektiöse Viruspartikel generiert und freigesetzt werden. Diese Viruspartikel sind phänotypisch komplementiert, was bedeutet, dass diese Viruspartikel intaktes pUL48 enthalten, aber nach Infektion der Wirtszellen nur mutiertes pUL48 gebildet werden kann. Für die Expression des intakten Proteins wurde ein Expressionsplasmid für WT-pUL48 mittels Elektroporation in die MRC-5 eingebracht. Anschließend wurden diese Zellen mit der gewünschten Virusmutante

infiziert. So entstand eine Cokultur infizierter Zellen, welche zusätzlich das pUL48-Expressionsplasmid enthielten mit nicht-infizierten Zellen, welche dieses Plasmid ebenfalls beinhalteten. Problematisch war hierbei das Einbringen des Expressionsplasmids, da die Transfektionseffizienz der Elektroporation bei nur ca. 40 % lag und es innerhalb der ersten 48 Stunden nach Transfektion zu vermehrtem Zelltod kam. Durch Optimierung des Ablaufs und häufigen Medienwechsel, sofort nach Adhärenz der Zellen am Boden der Kulturflaschen, konnten die Effizienz und das Gesamtüberleben der erfolgreich transfizierten Zellen noch einmal um ca. 10 - 20% (visuell, lichtmikroskopisch beurteilt) gesteigert werden. Ungefähr vier Tage nach der Infektion setzte eine lichtmikroskopisch erkennbare Plaquebildung infizierter Zellen ein und nach sieben Tagen konnten die ersten Virus-haltigen Überstände geerntet werden. Durch ständige Wiederholung der Transfektion und Infektion konnten nach ca. acht Wochen ausreichende Virusmengen für die Experimente der Arbeit generiert werden. Final konnten Virusstocks der Deletionsmutante TBUL48-DelC80 mit einem Titer von $1{,}4\times10^5$ PFU/ml und der Punktmutante TBUL48-5LtoA mit dem Titer von $8{,}9\times10^4$ PFU/ml generiert werden.

## 3.3 Generierung der TBUL48-DelC80 Revertante

Die Generierung dieses Virus sollte sicherstellen, dass der Phänotyp der Deletionsmutante TBUL48-DelC80 tatsächlich durch die eingebrachte Mutation bedingt ist. Dabei sollten unerwünschte Nebeneffekte als Ursache für die beobachteten Veränderungen im Phänotyp dieser Virusmutante ausgeschlossen werden. Die fehlenden C-terminalen 80 As sollten dazu in die TBUL-DelC80 Mutante reinseriert werden. Wenn der Phänotyp der mit dieser Revertante infizierten Zellen mit dem des Wildtyps identisch ist, kann die Deletion der 80As als Ursache des veränderten Phänotyps der TBUL-DelC80 Mutante deklariert werden.

Die Insertion der 80As erfolgte über die Technik der homologen Rekombination. Das Prinzip bildet dabei die Rekombination homologer DNA-Abschnitte, welche den Genabschnitt von Interesse (80 C-terminale As des pUL48) sowohl im Genom der Virusmutante als auch in der zugegebenen Nukleotidsequenz flankieren (Abbildung 11). Durch die Rekombination der homologen Sequenzen untereinander kommt es zur Insertion der gewünschten 80As in das Genom der Virusmutante TBUL48-

DelC80. Die zugeführte Nukleotidsequenz wurde durch PCR-Amplifikation des Wildtypgenoms für pUL48 gewonnen und umfasste die fehlenden 80As des pUL48 und flankierende Sequenzen für die homologe Rekombination. Das PCR-Produkt und die DNA der TBUL48-delC80 Mutante wurden zusammen durch Elektroporation in MRC-5 Zellen eingebracht, in welchen dann die homologe Rekombination erfolgte. Die so behandelten Zellen wurden täglich visuell mit dem Lichtmikroskop auf Plaquebildung untersucht, da in den Zellen ohne erfolgreiche homologe Rekombination keine Virusfreisetzung und somit auch keine Plaquebildung stattfinden konnte. Bei Plaquebildung wurden die Zellen dieses Ansatzes weiter kultiviert und die infektiösen Überstände geerntet. Mit den Überständen wurden dann frische Zellen infiziert. Diese Prozedur wurde bis zu viermal wiederholt. Für die Infektion der frischen Zellen wurden ausschließlich die geernteten Überstände mit den enthaltenen Viruspartikeln verwendet. Dadurch konnte eine potentielle Kontamination mit der Deletionsmutante TBUL48-DelC80 nahezu ausgeschlossen werden. Mit dem auf diese Weise generierten Überstand wurde zur Kontrolle ein Immunfluoreszenzexperiment durchgeführt. Dazu wurde der Überstand bei vollständiger Infektion der Zellen einer Kulturflasche geerntet. Dieser Zeitpunkt wurde durch visuelle Kontrolle unter dem Lichtmikroskop ermittelt. Der erhaltene Überstand wurde anschließend direkt titriert. Es wurden humane Fibroblasten in IBIDIs ausgesät und am Folgetag mit dem geernteten Überstand der Revertante oder dem Wildtypvirus (als Kontrolle) mit jeweils einer MOI von 0,5 infiziert. Das Experiment wurde am fünften Tag nach Infektion durch Fixierung beendet. Die Zellen wurden mit einem pUL48- Antikörper behandelt und dessen Lokalisation wurde durch Immunfluoreszenz visualisiert. Dabei konnte phänotypisch kein Unterschied zwischen dem Wildtypvirus und der Revertante beobachtet werden (siehe Abbildung 11). Somit bestätigten wir die erfolgreiche Generierung der Revertante TBUL48-DelC80-rev. Um absolute Sicherheit über die Sequenz der generierten Revertante zu erlangen, infizierten wir erneut Zellen mit deren Überstand, gewannen die DNA, reinigten sie auf und schickten diese zum Sequenzieren. Das Ergebnis bestätigte die erfolgreiche Herstellung der TBUL48-DelC80 Revertante, mit einer Sequenz, die dem WT gleicht. Aus dem gewonnenen Überstand wurde ein Virusstock für die folgenden Experimente hergestellt und titriert. Nach 14 Tagen ergab sich bereits ein Titer von $9{,}5\times10^{6}$ Viruspartikeln/ml Überstand. Das generierte Virus erhielt den Namen TBUL48-DelC80rev.

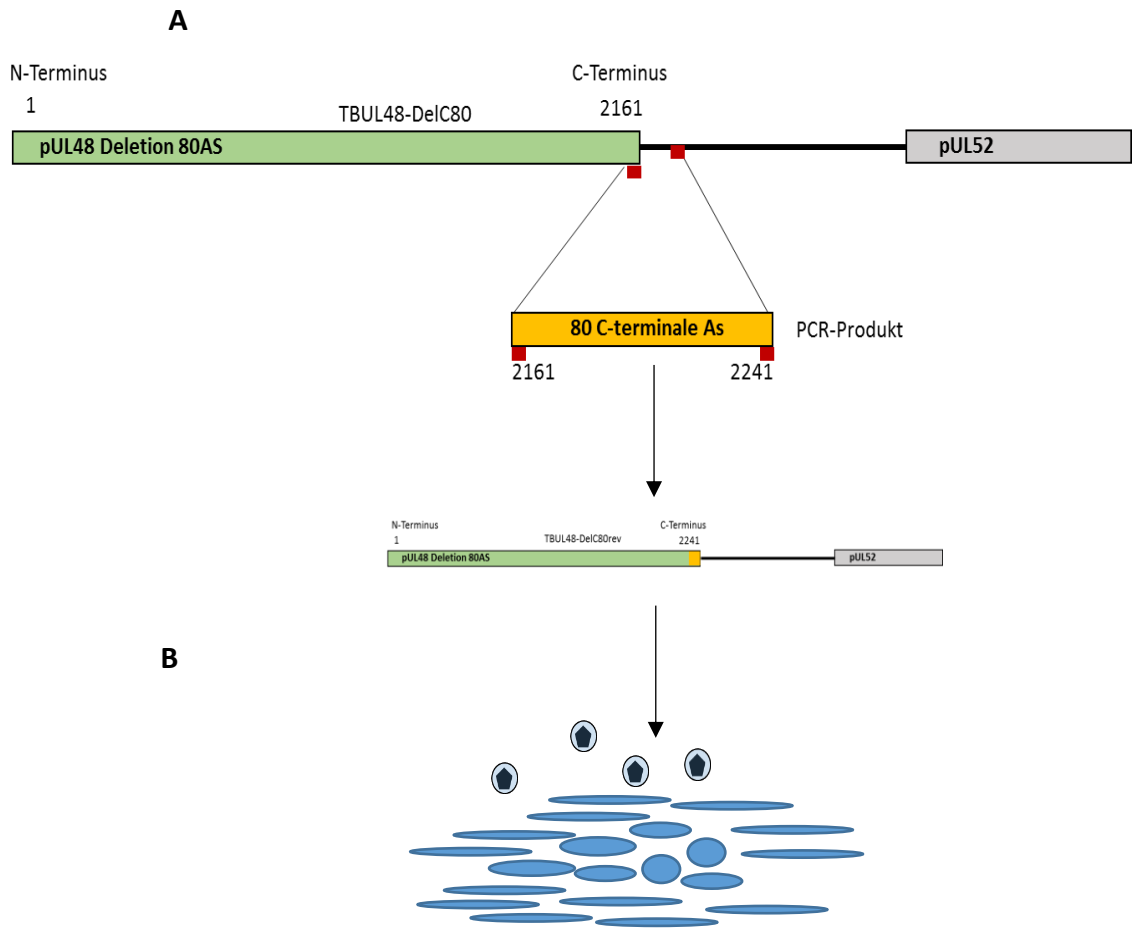



**Abbildung 10 Schematische Darstellung der Generierung der TBUL48-DelC80-Revertante**

Die Abbildung zeigt (nicht maßstabsgetreu) das Prinzip der Generierung von TBUL48-DelC80rev mittels homologer Rekombination. Vereinfachend werden hier die Genabschnitte für die Proteine als Aminosäuresequenz dargestellt. Wobei das pUL48 der Virusmutante TBUL48-DelC80 hier in grün und das zusätzliche Transferkonstrukt in gelb dargestellt werden. Die roten Abschnitte markieren die homologen Bereiche, zwischen welchen die Rekombination stattfindet. N steht für den N-Terminus und C für den C-Terminus des pUL48. Die Zahlen geben die Nummer der ersten und letzten Aminosäure (As) an. Teil **A** zeigt die homologe Rekombination mit dem Ergebnis. Teil **B** stellt schematisch die Zellen und den Überstand bei Aufnahme in Kultur dar. ⬟ symbolisiert die in den Überstand freigesetzten Viruspartikel.

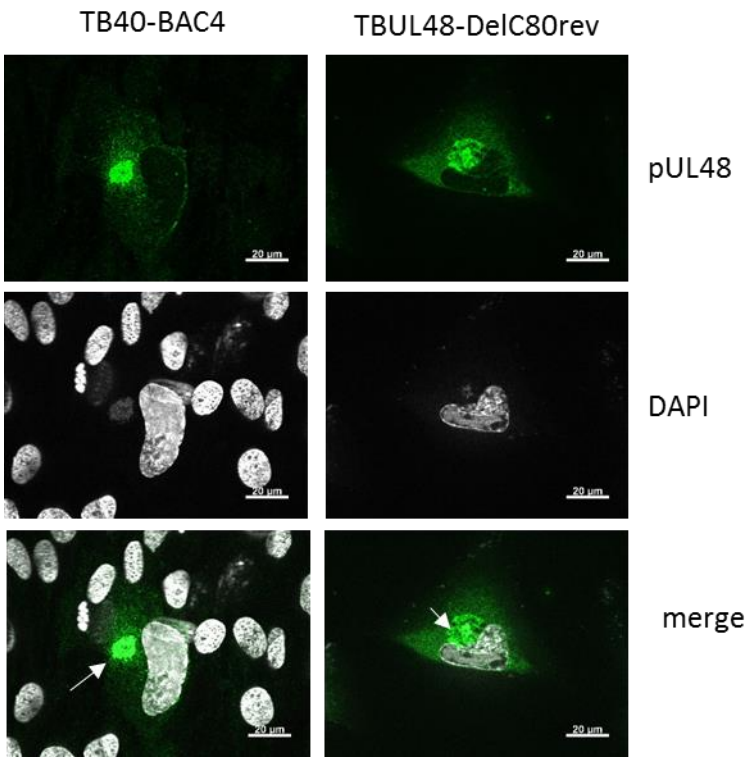



**Abbildung 11 Phänotyp des Wildtyp (TB40-BAC4) und der Revertante TBUL48-DelC80rev, 5 Tage nach Infektion**

Die Abbildung zeigt die Gegenüberstellung mit den beiden Viren infizierten HFF (Human Foreskin Fibroblasts) in der Immunfluoreszenzmikroskopie. Es wurde mit pUL48 (erste Zeile) und DAPI (mittlere Zeile) gefärbt. Die weißen Pfeile deuten auf die DAPI-Akkumulationen im vAC (viral assembly complex). Der Maßstabsbalken entspricht 20µm im Original.

## 3.4 Charakterisierung der HCMV-48-5LtoA Virusmutante

### 3.4.1 Virusausbreitung

Für die Ausbreitung von Herpesviren in der Zellkultur sind zwei verschiedene Möglichkeiten bekannt. Die Virusausbreitung kann über die Freisetzung von Virionen erfolgen, welche dann frische Zellen infizieren. Die zweite Möglichkeit ist die direkte Zell-zu-Zell-Infektion, welche nicht durch neutralisierende Antikörper gehemmt werden kann [87]

#### 3.4.1.1 Defekt bei der Zell-zu-Zell Ausbreitung von TBUL48-5LtoA

Um die Fähigkeit zur direkten Zell-zu-Zell Ausbreitung der TBUL48-5LtoA – Punktmutante im Vergleich zum Wildtyp zu untersuchen, wurde ein Fokus-Expansion-Assay durchgeführt. In diesem Assay wurde die TBUL48-5LtoA – Punktmutante zusätzlich auch mit der Deletionsmutante TBUL48-DelC80 und der Revertante TBUL48-DelC80rev verglichen.

Für den Fokus-Expansion-Assay wurden HFF-Zellen in 24-well-Platten ausgesät und jeweils mit einer MOI von 0,06 des entsprechenden Virusstamms für 24h infiziert. Anschließend wurden die Zellen mit einer Gamunex-Medium Mischung inkubiert, welche durch die Anwesenheit von neutralisierenden Antikörpern nur die direkte Zell-zu-Zell-Ausbreitung zulässt. Um für die Dauer des Experimentes die neutralisierende Wirkung der Antikörper zu gewährleisten, wurde die Gamunex-Medium Mischung alle drei Tage ausgewechselt. Das Experiment wurde am siebten Tag nach der Infektion durch Fixierung beendet. Zur Bestimmung der Anzahl infizierter Zellen pro Fokus wurden die infizierten Zellen durch eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung auf das HCMV-immediate early (IE) Antigen gefärbt und mikroskopisch ausgewertet.

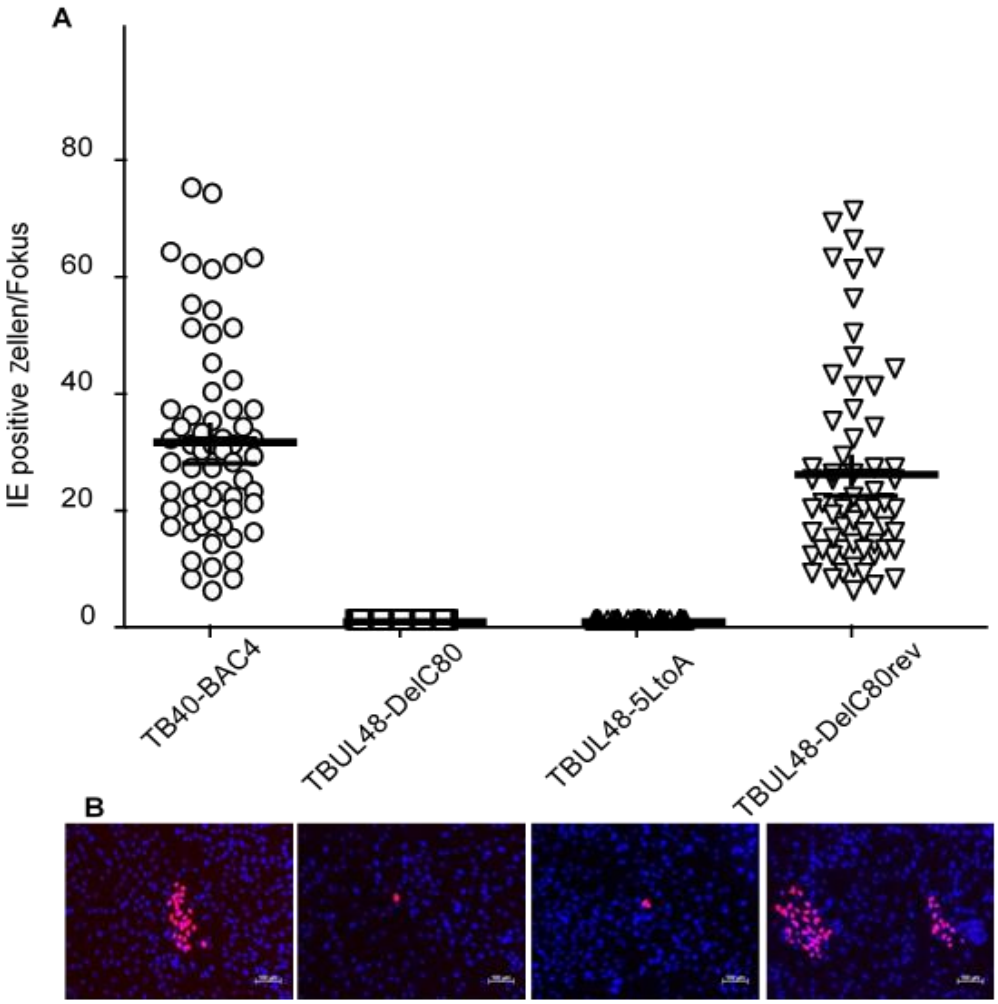



**Abbildung 12: Fokus-Expansion-Assay der Virusmutanten mit Mutationen im C-Terminus von pUL48**

Konfluente HFF (Human Foreskin Fibroblasts) wurden jeweils mit dem Wildtypvirus ‚TB-UL48-DelC80, TBUL48-5LtoA und der Revertante TBUL48-DelC80rev mit einer MOI (Multiplicity of infection) von 0,06 für 24 Stunden infiziert und anschließend mit einem Gamunex-Medium Gemisch für 6 Tage inkubiert. 7 Tage nach Infektion wurde das Experiment durch Fixierung beendet. **A** Jeder Datenpunkt im Diagramm zeigt die Anzahl IE (Immediate-early)-positiver Zellen pro Fokus. Dargestellt sind außerdem der Mittelwert (breiter Querbalken) und die Standardabweichung (Längsbalken) für die verschiedenen Viren. **B** Die Bilder stellen repräsentative Aufnahmen der infizierten Zellen an Tag 7 nach der Infektion dar. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI (blau) und zusätzlich eine Färbung mit anti-immediate early (rot). Der Maßstabsbalken repräsentiert 100µm des Originals.

Wie die Abbildung 12 zeigt, waren in der Infektion mit dem Wildtypvirus TB40-BAC4 nach sieben Tagen deutliche Virusplaques mit einem Durchschnitt von 36,1 infizierten Zellen zu detektieren. Im Gegensatz dazu konnten bei der Infektion mit der TBUL48-5LtoA Virusmutante ausschließlich einzelne infizierte Zellen gefunden werden. Eine Ausbreitung der Infektion auf benachbarte Zellen schien nicht erfolgt

zu sein. Dies konnte auch für das Kontrollvirus TBUL48-DelC80 gefunden werden, für welches ein Defekt bei der Virusausbreitung bereits bekannt war (persönliche Kommunikation, Jens von Einem). Die Revertante TBUL48-DelC80rev bildete Plaques mit einem Mittel von 30 infizierten Zellen. Dies weicht nur geringfügig von der Plaquegröße des Wildtypvirus ab. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass der C-Terminus von pUL48 und insbesondere der darin vorkommende Leucin-reiche Bereich eine essentielle Funktion bei der Zell-zu-Zell Ausbreitung von HCMV spielt.

Durch die Experimentdauer von 7 Tagen im ersten Focus-Expansion-Assay konnten lediglich Aussagen für Prozesse dieses Zeitraums gemacht werden. Um eine verzögerte Zell-zu-Zell-Ausbreitung (ab dem 7. Tag) auszuschließen, wurde das Experiment ein zweites Mal mit einer Dauer von 15 Tagen durchgeführt. Dieser Zeitrahmen wurde durch die begrenzte Überlebenszeit infizierter Fibroblasten bestimmt. Die Infektion und die Inkubation mit neutralisierenden Antikörpern sowie die Auswertung erfolgten wie oben beschrieben.

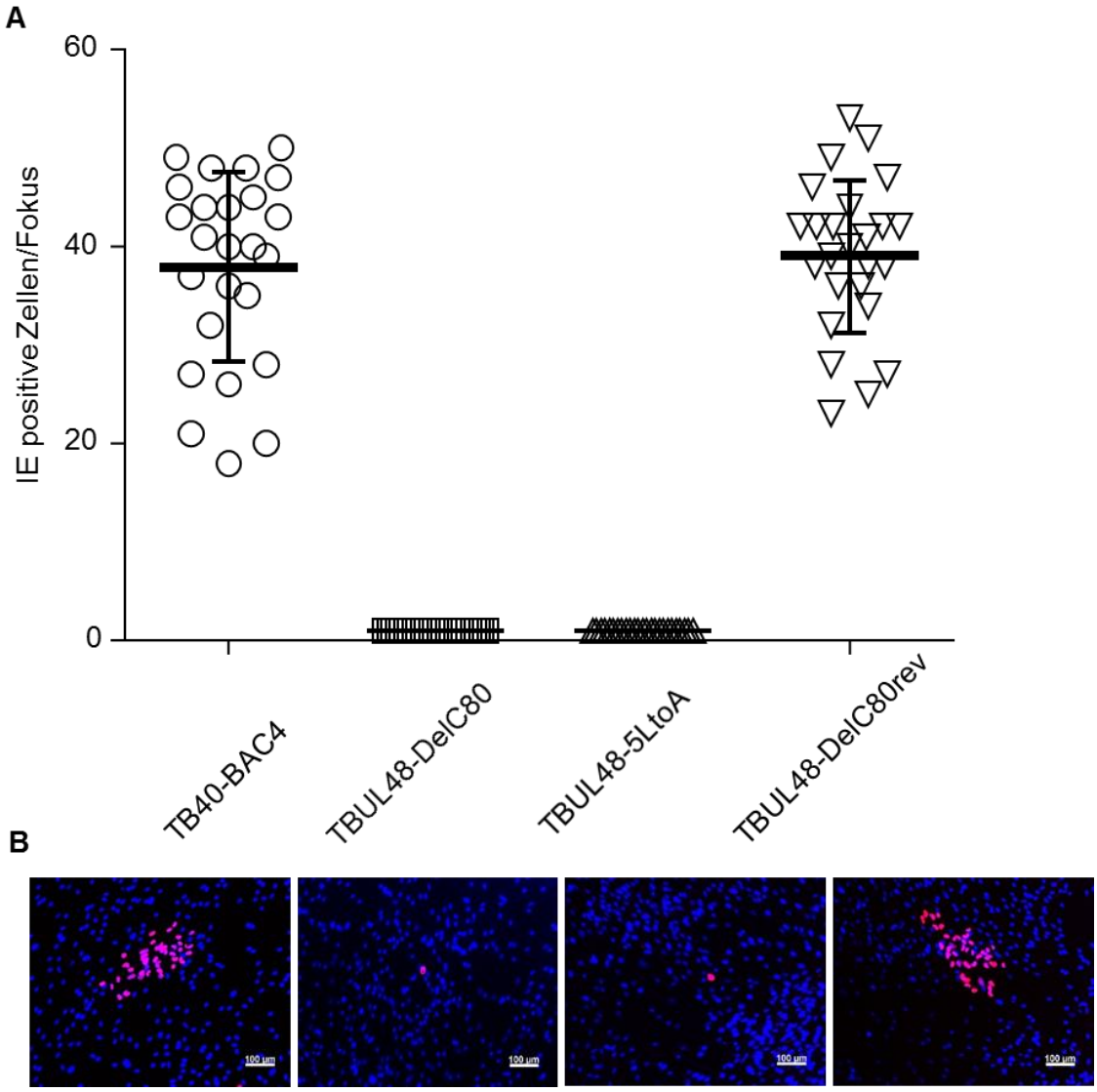



**Abbildung 13: Fokus-Expansion-Assay von Virusmutanten mit Mutationen im C-Terminus von pUL48**

HFF (Human foreskin fibroblasts) wurden jeweils mit dem Wildtypvirus, TB-UL48-DelC80, TBUL48-5LtoA und der Revertante TBUL48-DelC80rev, mit einer MOI (Multiplicity of infection) von 0,06, für 24 Stunden infiziert und anschließend mit einem Gamunex-Medium Gemisch für 6 Tage inkubiert. 15 Tage nach Infektion wurde das Experiment durch Fixierung beendet. **A** Jeder Datenpunkt im Diagramm zeigt die Anzahl IE (Immediate-early)-positiver Zellen pro Fokus, außerdem sind der Mittelwert (breiter Querbalken) und die Standardabweichung (Längsbalken) der verschiedenen Viren gezeigt. **B**: Die Bilder stellen repräsentative Aufnahmen der infizierten Zellen, nach Fixierung, am 15. Tag nach Infektion dar. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI (blau) und zusätzlich eine Färbung mit anti-immediate early (rot). Zu erkennen ist die Anzahl infizierter Zellen pro Fokus. Der Maßstabsbalken repräsentiert 100µm des Originals.

Der HCMV Wildtyp TB40-BAC4 zeigte eine durchschnittliche Menge von 38 immediate early (IE) positiven Zellkernen pro Virusplaque (siehe Abbildung 13). Nach Infektion mit der Virusmutante TBUL48-5LtoA ergaben sich wieder

ausschließlich singuläre, immediate early (IE) positive Zellen, ohne erkennbare Infektion direkt benachbarter Fibroblasten. Im Durchschnitt ergab sich hier also eine Menge von einer infizierten Zelle pro Fokus Auch das Referenzvirus TBUL48-DelC80 zeigte erneut dasselbe Ergebnis. Die Revertante TBUL48-DelC80rev wies am 15. Tag einen Mittelwert von 39 immediate early (IE) positiven Zellen pro Fokus auf. Dieses Ergebnis führte somit zur Bestätigung des bereits im vorhergehenden Experiment gefundenen Defekts der direkten Zell-zu-Zell Ausbreitung der Virusmutanten TBUL48-5LtoA und TBUL48-DelC80.

### 3.4.2 Virusfreisetzung

#### 3.4.2.1 Defekt bei der Bildung und Freisetzung infektiöser Viruspartikel

Die zweite Möglichkeit der Virusausbreitung ist die Freisetzung infektiöser Viruspartikel durch bereits infizierte Zellen und eine anschließende Infektion neuer Wirtszellen durch diese freien Viruspartikel. Um herauszufinden, ob sich die in HCMV-48-5LtoA eingebrachten Mutationen auf die Bildung oder Freisetzung infektiöser Viren auswirken, wurde das Wachstum dieser Mutante in zwei unterschiedlichen Wachstumskinetiken mit dem des Wildtypvirus verglichen.

#### 3.4.2.2 High-MOI-Wachstumskinetik

In einer High-MOI-Wachstumskinetik, bei welcher durch den Einsatz einer hohen Virusmenge nahezu alle Zellen infiziert werden, wurde das Wachstumsverhalten, bzw. die Menge freigesetzter Viruspartikel der Mutante TBUL48-5LtoA mit dem Wildtypvirus verglichen. Außerdem sollten auch Unterschiede zur Referenzmutante TBUL48-DelC80 geprüft werden. Als Kontrolle diente noch die Revertante TBUL48-DelC80rev. Für die High-MOI-Wachstumskinetik wurde zur Infektion der HFF eine hohe Virusmenge verwendet, um eine initiale Infektion aller Zellen zu erhalten. Die Infektion erfolgte jeweils mit einer MOI von 1 für die verschiedenen Viren. Die Infektion wurde nach einer Inkubationszeit von vier Stunden durch Waschen mit PBS/EDTA und einem anschließenden Medienwechsel beendet. Die Überstände der infizierten Zellen wurden nach jeweils 24 Stunden, 72 Stunden, 120 Stunden

und 168 Stunden abgenommen und die darin enthaltene Menge infektiöser Viren durch Titration ermittelt.

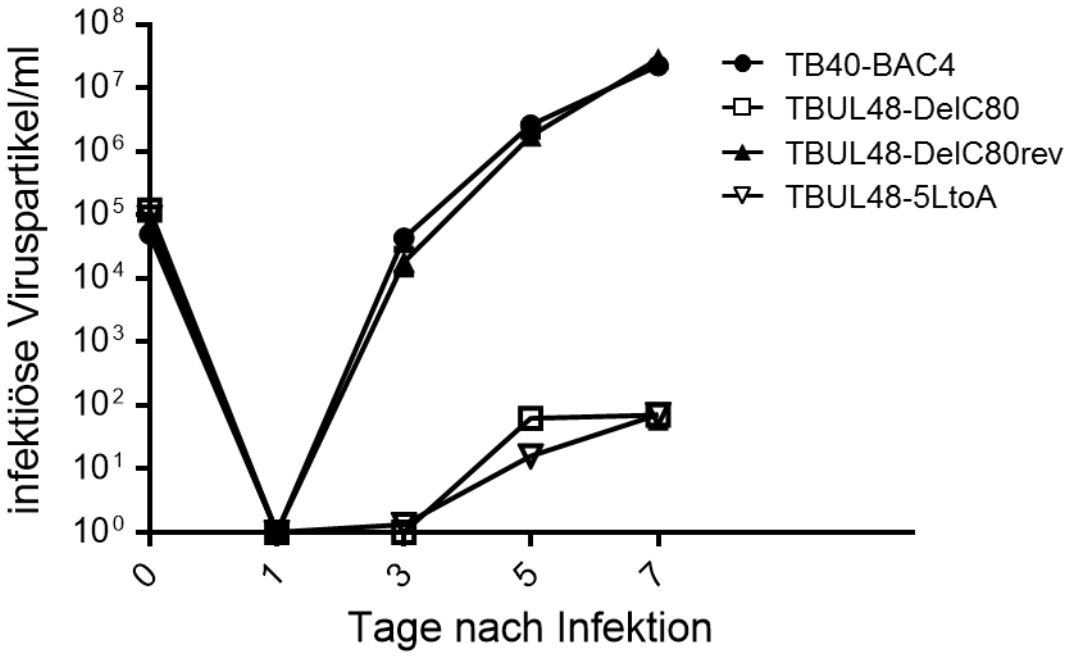



**Abbildung 14: Auswirkungen der Mutationen im C-Terminus des Tegumentproteins pUL48 auf die Bildung und Freisetzung infektiöser Viruspartikel**

HFF (Human foreskin fibroblasts) wurden mit dem Wildtypvirus (TB40-BAC4), TBUL48-DelC80, der zugehörigen Revertante TBUL48-DelC80rev, und TBUL48-5LtoA, mit je einer MOI (Multiplicity of infection) von 1, infiziert. Die Überstände infizierter Zellen wurden jeweils einen, drei, fünf und sieben Tage nach der Infektion geerntet und die Menge an freigesetzten infektiösen Viruspartikeln durch Titration bestimmt. Die Kurven stellen die Anzahl infektiöser Viruspartikel/ml im Überstand zum jeweiligen Zeitpunkt logarithmisch dar. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert aus 3 Experimenten, n=3. Zu jedem Punkt des Diagramms wird die entsprechende Standardabweichung als Längsbalken (auf Grund geringer Abweichungen schwer erkennbar) gezeigt. Die Kurven von Wildtyp und Revertante haben schwarze Symbole und die Mutanten zur Gegenüberstellung weiße Symbole.

Die Ergebnisse der Wachstumskinetik sind in Abbildung 14 dargestellt. Wie erwartet, konnten für das Wildtypvirus TB40-BAC4 24 Stunden nach Infektion noch keine Viruspartikel im Überstand detektiert werden. Erst ab dem dritten Tag wurden etwa $10^4$ infektiöse Viruspartikel/ml im Überstand gefunden, die Menge stieg bis zum siebten Tag auf $10^7$infektiöse Viruspartikel/ml. Die Freisetzungskurve der Revertante TBUL48-DelC80rev zeigte keine wesentlichen Unterschiede zu der des Wildtypvirus. Die Kurve der Deletionsmutante TBUL48-DelC80 zeigte ein

abweichendes Verhalten. Sowohl 24 Stunden als auch 72 Stunden nach der Infektion konnten keine infektiösen Viruspartikel im Überstand detektiert werden. Am fünften Tag nach Infektion wurde eine geringe Menge von im Durchschnitt 61 infektiösen Partikeln/ml Überstand gefunden, welche bis zum siebten Tag nicht relevant anstieg. Somit unterschied sich die maximale Menge an, von TBUL48-DelC80 in den Überstand freigesetzten, infektiösen Viruspartikeln im Vergleich zum WT und der Revertante am siebten Tag, um das 10000-fache.

Die Virusmutante TBUL48-5LtoA zeigte eine Freisetzungskurve, die der Deletionsmutante sehr ähnlich war. Nach 24 Stunden zeigte sich, wie bei allen Virusinfektionen, keine Freisetzung infektiöser Partikel. Zum Zeitpunkt 3 Tage nach Infektion kam es mit durchschnittlich einem Viruspartikel/ml ebenfalls zu keiner relevanten Freisetzung. Am 5. Tag nach Infektion konnten durchschnittlich 21 infektiöse Viruspartikel/ml Medium nachgewiesen werden und ein leichter Anstieg auf 80/ml am siebten Tag verzeichnet werden. Ausgehend von der logarithmischen Skala ist kein relevanter Unterschied zur TBUL48-DelC80 Virusmutante zu erkennen. Allerdings beträgt auch hier die signifikante Differenz zum Wildtyp (WT) nach sieben Tagen erneut fünf Logarithmusstufen und die Freisetzung scheint um das 100000- fache verringert.

#### 3.4.2.3 Low-MOI-Wachstumskinetik

Das Ziel dieses Experiments war es, das Wachstumsverhalten der Virusmutante TBUL48-5LtoA und der als Referenz dienenden TBUL48-DelC80 Mutante über einen längeren Zeitraum zu analysieren. HFF wurden mit den Viren TB40-BAC4, TBUL48-DelC80, TBUL48-DelC80rev und TBUL48-5LtoA mit jeweils einer MOI zwischen 0,05 und 0,06 infiziert. Dabei erfolgte die Infektion mit dem Wildtypvirus und der Revertante TBUL48-DelC80rev mit einer etwas geringeren Virusmenge (MOI 0,05) als die Infektion mit den anderen zwei Virusmutanten (MOI 0,06). Diesmal wurden die Überstände zu den Zeitpunkten vier Stunden, 24 Stunden, drei Tage, 6 Tage, 9 Tage, 12 Tage und 18 Tage nach Infektion geerntet und unmittelbar nach der Ernte titriert. Wegen der sehr geringen Virusmenge, die für die Infektion verwendet wurde, sollte ein Nachweis der stattgefundenen Infektion in das Experiment integriert werden. Dazu wurden die infizierten Zellen am 18. Tag durch

eine Immunfluoreszenzfärbung mit einem anti-immediate early (IE) Antikörper detektiert.

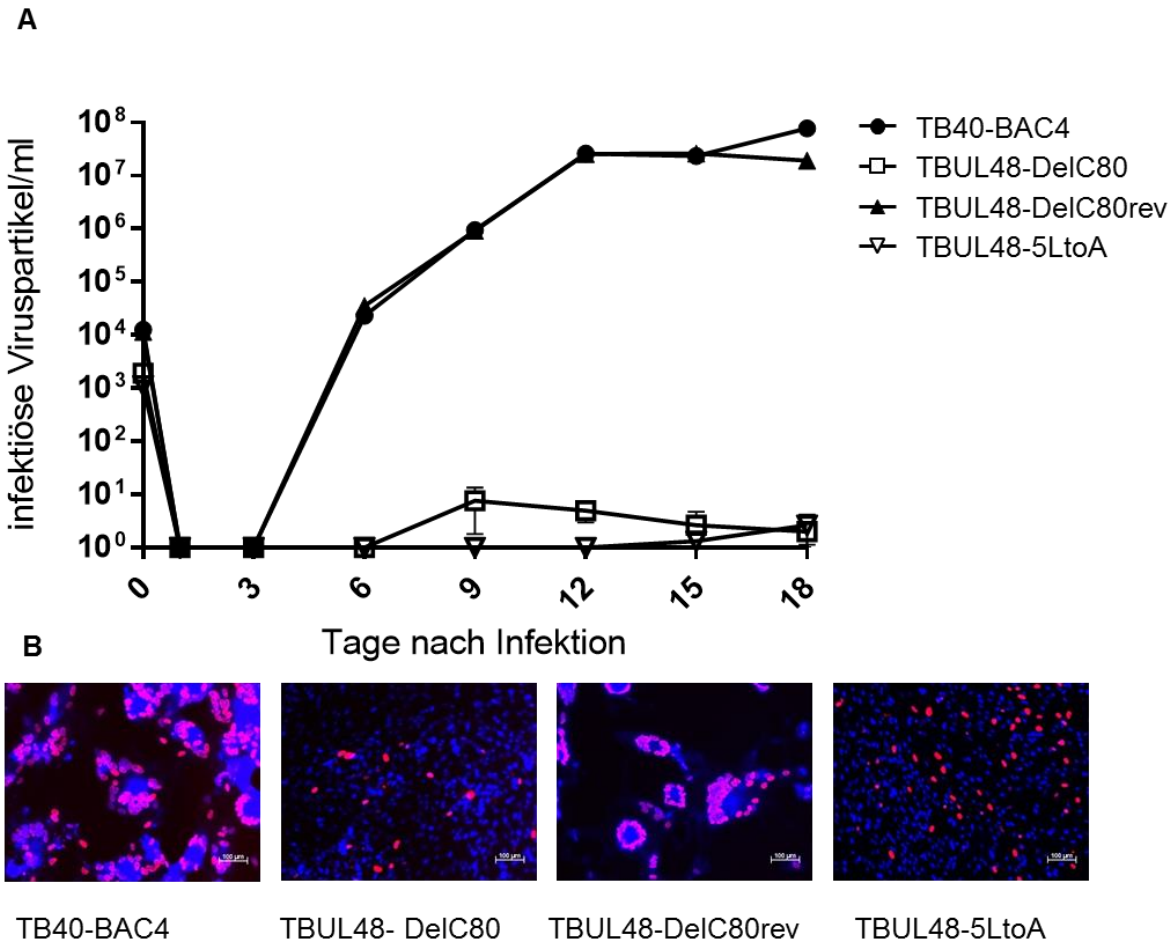



**Abbildung 15 Auswirkungen der Mutationen im C-terminalen Bereich des Tegumentproteins pUL48 auf die Bildung und Freisetzung infektiöser Viruspartikel. Beobachtungszeitraum 18 Tage nach Infektion**

HFF(Human foreskin fibroblasts) wurden mit dem Wildtypvirus (TB40-BAC4), TBUL48-DelC80, TBUL48-DelC80rev und TBUL48-5LtoA, mit je einer MOI (Multiplicity of infection) zwischen 0,05 und 0,06 für 24 Stunden infiziert. Der Überstand wurde 1,3,6,9,12,15 und 18 Tage nach Infektion geerntet und direkt titriert.

**A** Die Graphik zeigt die Menge freigesetzter Viruspartikel pro ml geernteten Überstands, bezogen auf das jeweilige Virus. Für jeden Zeitpunkt ist die gemittelte Menge aus jeweils drei Experimenten (n=3) mit Standardabweichung gezeigt (auf Grund der geringen Abweichungen schwer erkennbar). **B** Auswahl repräsentativer Aufnahmen der infizierten Zellen am 15. Tag, in rot die Immunfluoreszenzfärbung mit dem anti-immediate-early Antikörper, in blau die DAPI- Färbung der Zellkerne. Der Maßstabsbalken entspricht 100µm im Original.

Das Wachstumsverhalten der verschiedenen Virenstämme zeigte sich wie in Abbildung 15 dargestellt: Für das Wildtypvirus TB40-BAC4 konnten 24 Stunden nach der Infektion keine Viruspartikel im Überstand nachgewiesen werden. Auch

zum Erntezeitpunkt des dritten Tages zeigten sich keine infektiösen Virionen im Überstand. Am sechsten konnte bereits ein Titer von über $10^4$ Viruspartikeln pro ml Überstand verzeichnet werden. In drei Tages Abschnitten nahm die Menge an infektiösem Virus bis zum 15. Tag um jeweils eine Logarithmusstufe zu. Am 18. Tag nach der Infektion erreichte sie ihr Maximum mit durchschnittlich $8x10^7$Virionen/ml Überstand. Das Experiment wurde zu diesem Zeitpunkt beendet, da die visuelle Kontrolle in jedem Ansatz ein massives Absterben der infizierten Zellen zeigte (Abbildung 15B). Die Virusmutante TBUL48-DelC80 unterschied sich im Wachstumsverhalten deutlich vom Wildtypvirus. Sowohl 24 Stunden wie auch drei und sechs Tage nach der Infektion ließen sich im Überstand keine infektiösen Partikel nachweisen. Am neunten Tag gelang in diesem Experiment der erste Nachweis infektiöser Viruspartikel im Überstand mit einer absoluten Anzahl von durchschnittlich 7,5 infektiösen Viruspartikeln/ml. Zum Zeitpunkt des 12. Tags sank diese Menge auf durchschnittlich 5 infektiöse Partikel/ml und am 15. Tag wurde sogar keine nachweisbare Freisetzung beobachtet. Am 18. Tag konnten dann im Durchschnitt wieder 2,75 infektiöse Partikel/ml Überstand detektiert werden. Die mit TBUL48-DelC80 infizierten Zellen setzten folglich am 18. Tag nach Infektion 1000000- Mal weniger infektiöse Viruspartikel frei als Zellen, die mit dem WT-Virus infiziert wurden. Dieser Unterschied von sechs Logarithmusstufen, im Vergleich mit dem Wildtypvirus, zeigte ein deutliches Defizit in der Freisetzung infektiöser Viruspartikel für die TBUL48-DelC80-Mutante. Es konnte im Verlauf des Experimentes für TBUL48-DelC80 auch kein kontinuierlicher Zuwachs der freigesetzten Partikelmenge verzeichnet werden, wie dies für das Wildtypvirus zu beobachten war.

Nach Infektion mit der Virusmutante TBUL48-5LtoA wurden bis zum neunten Tag keine infektiösen Viruspartikel im Überstand detektiert. Am 12. Tag konnte pro ml Überstand im Durchschnitt 1 infektiöses Viruspartikel gefunden werden. Ein leichter Anstieg ließ sich an den Tagen 15 und 18 nach Infektion beobachten, dabei konnten bis zu maximal 7 infektiöse Viruspartikel/ml gefunden wurden. Auch diese Wachstumskurve zeigte, bei einem längeren Beobachtungszeitraum von 18 Tagen, dass sich die Anzahl freigesetzter, infektiöser Virionen nach Infektion mit der Mutante TBUL48-5LtoA um das 1000000-fache vom Wildtypvirus unterschied.

### 3.4.3 Kontrolle der Expression von pUL48

Dieses Experiment sollte mittels Westernblot überprüfen, ob die Mutationen zu unerwünschten Veränderungen z.B. der Größe von pUL48 führten. Die Verwendung eines Referenzproteins als Marker für die Menge infizierter Zellen einer Probe erlaubte auch die Analyse der pUL48- Expressionslevel im Vergleich mit dem Wildtypvirus.

HFF wurden mit den Viren TB40-BAC4, TBUL48-DelC80, dessen Revertante TBUL48-DelC80rev und TBUL48-5LtoA infiziert. Dies erfolgte jeweils mit einer MOI von 3, um eine Infektion aller ausgesäten Zellen zu erreichen. Die angestrebte vollständige Infektion konnte am Folgetag lichtmikroskopisch für alle vier Viren bestätigt werden. Am 5. Tag nach der Infektion wurden die Zellen lysiert und die Lysate mit Hilfe des Westernblots analysiert. Als Negativkontrolle wurden Lysate nicht infizierter HFF (Mock) mitgeführt. Die Membran wurde mit einem anti-pUL-48 Antiköper und einem anti-*major capsid protein* (MCP)-Antikörper inkubiert. MCP diente dabei als Ladekontrolle und Marker für eine vergleichbare Infektion der Zellen. Die Lademengen der einzelnen Proben wurden in zahlreichen Vorversuchen ermittelt. Dabei sollte die Menge infizierter Zellen (entspricht der MCP-Bande), zur besseren Vergleichbarkeit der pUL48-Expression, in allen Proben ungefähr gleich sein.

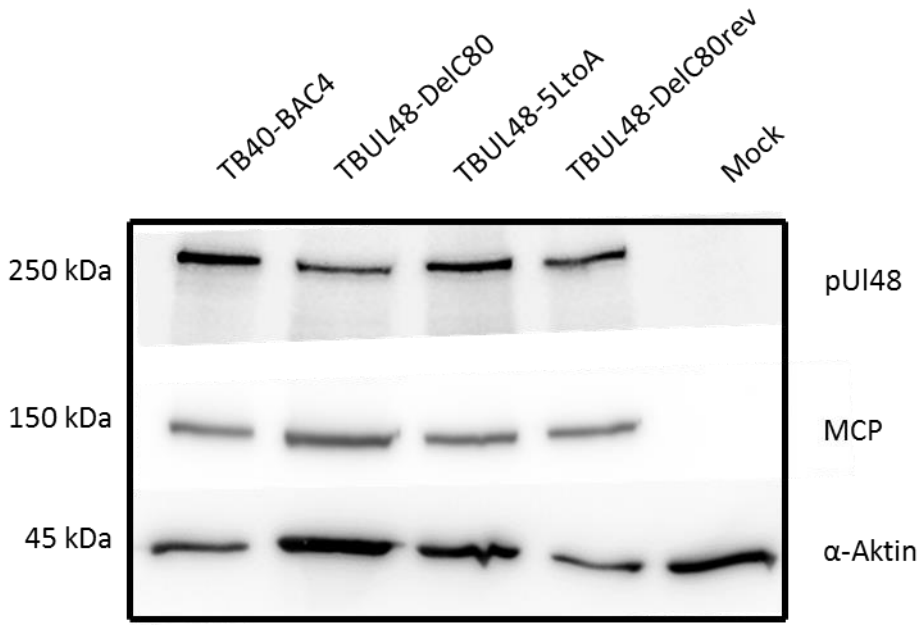



**Abbildung 16. Expression von pUL48 in infizierten Zellen**

Humane Fibroblasten (HFF) wurden mit dem Wildtypvirus, TBUL48-DelC80, der Revertante TBUL48-DelC80rev und TBUL48-5LtoA mit jeweils einer MOI (Multiplicity of infection) von 3 infiziert, nach 5 Tagen geerntet und lysiert. Die Lysate wurden mittels eines SDS-Gels (Sodium dodecyl Sulfat) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran (Polyvinyliden Difluorid) geblottet. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem anti-pUL48 Primärantikörper. Zur Bestimmung der infizierten Zellmenge wurde dieselbe Membran ebenfalls mit anti-MCP-Primärantikörper behandelt. Als zellulärer Marker wurde Aktin bestimmt. Diese Abbildung zeigt die Banden für die verschiedenen Lysate mit Angabe ihrer Laufhöhe in kDa (Laufhöhe des Markers links im Bild angegeben) und Intensität.

Die Proben für TB40-BAC4, TBUL48-5LtoA und TBUL48-DelC80 rev zeigten nach Behandlung mit dem anti-MCP Antikörper jeweils eine Bande vergleichbarer Größe und Intensität, welche bei 150kDa detektiert wurde (siehe Abbildung 16). Im Vergleich dazu präsentierte sich die entsprechende Bande des Lysates aus TBUL48-DelC80 infizierten Zellen als geringfügig prominenter. Sie zeigte sich wiederholt etwas breiter und wies eine stärkere Intensität auf. Dies ist ein Indiz für eine größere Menge infizierter Zellen im aufgetragenen Lysat. Die Probe nicht infizierter Zellen (Mock) zeigte wie erwartet keine Bande auf dieser Höhe. Die Inkubation mit dem anti-pUL48-Antikörper ergab eindeutige Banden für pUL48 in den Lysaten von TB40-BAC4, TBUL48-5LtoA, TBUL48-DelC80 und der Revertante TBUL48-DelC80rev bei 250kDa. Die Banden wiesen ähnliche Intensitäten auf, wobei jedoch für TBUL48-DelC80 eine geringere Intensität imponierte. Zusätzlich

schien diese Bande ein wenig tiefer zu laufen als die anderen pUL48 Banden. Diese Beobachtung könnte, im Vergleich mit dem WT-pUL48, zeigen, dass nach Infektion mit der TBUL48-DelC80-Mutante ein kleineres pUL48 exprimiert wird. Im Lysat nicht infizierter Zellen konnte keine pUL48-spezifische Bande detektiert werden, was die Spezifität des anti-pUL48 Antikörpers bestätigt.

Die Detektion von zellulärem Aktin diente als zusätzliche Ladekontrolle, da Aktin auch in nicht-infizierten Zellen zu finden ist. Nach Inkubation mit dem anti-Aktin Antikörper zeigten sich bei ca. 45kDa Banden für alle Lysate und auch die nicht-infizierter Zellen. Die Bande des Virusstamms TBUL48-DelC80 war im Vergleich breiter und intensiver als die der übrigen Viren. Auch dies deutete wie oben bereits beschrieben auf eine größere Anzahl im Lysat enthaltener Zellen hin. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Expressionslevel von pUL48 bei einer Infektion mit der Virusmutante TBUL48-5LtoA nicht vermindert scheinen. Auch das Molekulargewicht scheint nicht relevant verändert. Bei Infektion mit TBUL48-DelC80 war trotz höherer Anzahl infizierter Zellen in der Probe ein vermindertes pUL48-Proteinlevel detektierbar. Das Protein zeigte eine veränderte Bandenhöhe und besitzt in Folge der Deletion ein geringeres Molekulargewicht.

### 3.4.4 Veränderte intrazelluläre Lokalisation des Tegumentproteins pUL48

Zur weiteren Charakterisierung der C-terminalen Punktmutante TBUL48-5LtoA wurde mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz die Lokalisation von pUL48 während der Infektion untersucht und mit der des Wildtyp-pUL48 verglichen. Insbesondere sollte geklärt werden, ob die Punktmutationen einen Einfluss auf den nukleären Exports von pUL48 haben, was auf Grund von Sequenzanalysen und Vorexperimenten vermutet wurde. Besonderes Augenmerk lag folglich auf den Signalen im Bereich des Zellkerns, welche Hinweise auf eine mögliche Beeinträchtigung des Kernexports liefern können. Bei Beeinträchtigung oder einem kompletten Funktionsverlust der nukleären Exportsequenz (NES) sollte es zu einer vermehrten Anreicherung von pUL48 im Zellkern kommen. Auch in diesen Experimenten wurden als Kontrollen die Virusmutante TBUL48-DelC80 und die Revertante TBUL48-DelC80rev miteinbezogen.

Für die Immunfluoreszenz wurden humane Fibroblasten in IBIDIs ausgesät und jeweils mit einer MOI von 0,5 für vier Stunden infiziert. Das Virus-haltige Medium wurde abgenommen, die Zellen mehrmals mit PBS gewaschen und in frischem Nährmedium inkubiert. Fünf Tage nach der Infektion wurden die Zellen fixiert und pUL48 mittels indirekter Immunfluoreszenz detektiert. Nukleinsäuren wurden mit Hilfe von DAPI gefärbt.

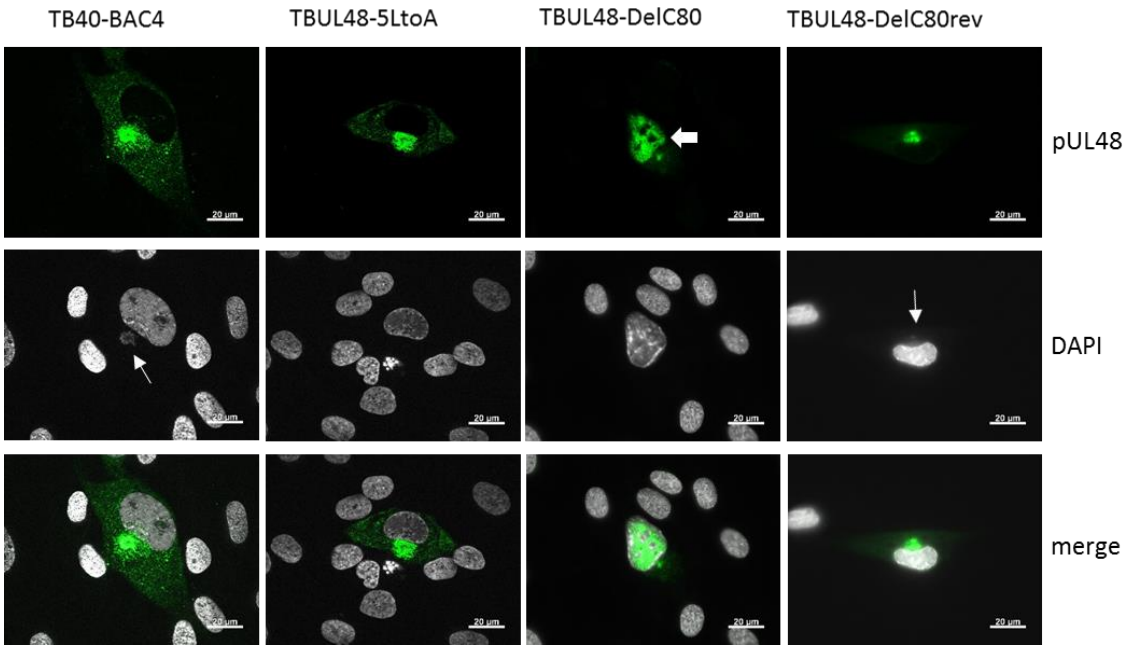



**Abbildung 17 Lokalisation von pUL48 in infizierten humanen Fibroblasten (HFF), 5dpi**

Die Abbildungen zeigen repräsentative Aufnahmen mit Wildtypvirus, TBUL48-5LtoA, TBUL48-DelC80 und TBUL48-DelC80rev infizierter HFF. Fünf Tage nach Infektion wurden die Zellen fixiert. pUL48 wurde mit α-pUL48 (grün), hier in der erste Zeile zu sehen, detektiert. Der Zellkern wurde mit DAPI (weiß), hier mittlere Zeile, dargestellt. Der Pfeil (➡) in der oberen Reihe deutet auf die pUL48- Lokalisation im Kern der Mutante TBUL48-DelC80. Die weißen dünnen Pfeile (⟶) zeigen die DAPI-Akkumulationen im vAC (viral assembly complex) des Wildtyps und der TBUL48-DelC80rev. Der Maßstabsbalken entspricht 20µm im Original.

Wie in Abbildung 17 gezeigt, ergab sich für den Wildtyp (TB40-BAC4) bei der Auswertung mittels Immunfluoreszenzmikroskopie ein deutliches zytoplasmatisches Signal für pUL48. Dabei fiel auf, dass pUL48 hauptsächlich im Bereich des sogenannten vAC akkumulierte. Im Kern hingegen fand sich kein eindeutiges pUL48-Signal. Daraus lässt sich, am fünften Tag nach Infektion, für das Wildtypvirus auf eine vorwiegend zytoplasmatische Lokalisation von pUL48 schließen. DAPI wurde wie erwartet im Zellkern detektiert. Des Weiteren konnte auch im vAC der Wirtszellen ein DAPI-positives Signal beobachtet werden. Dieses kann in Mock-Zellen nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigt) und basiert auf

Akkumulation viraler Nukleokapside. Fünf Tage nach Infektion mit der Virusmutante TBUL48-5LtoA zeigte sich ein klar erkennbares pUL48-Signal im Zytoplasma der Zellen. Eine besonders intensive Akkumulation konnte im Bereich des perinukleären vAC beobachtet werden. Im Bereich des Zellkerns konnte, wie beim WT-Virus, kein positives Signal detektiert werden. Dieses Verteilungsmuster gleicht wider Erwarten genau der pUL48-Lokalisation nach Infektion mit Wildtypvirus. Jedoch konnten für TBUL48-5LtoA keine DAPI-Signale im vAC gefunden werden.

Für die Mutante TBUL48-DelC80 konnte eine veränderte pUL48-Lokalisation beobachtet werden. pUL48 ließ sich hauptsächlich im Zellkern detektieren. Es konnten aber gleichzeitig auch schwache Signale im Zytoplasma und im vAC gefunden werden. Diese Beobachtungen lieferten bereits den Grundstein für die Generation der TBUL48-5LtoA Mutante und die Basis dieser Arbeit. Sie lassen auf eine Beeinträchtigung des nukleären Exports von pUL48 durch die Deletion der letzten 80 Aminosäuren des C-Terminus schließen. Auch nach Infektion mit dieser Mutante ließen sich keine DAPI- Signale im vAC nachweisen. Das Virus TBUL48-DelC80rev zeigte dasselbe pUL48-Lokalisationsmuster wie der Wildtyp, eine deutliche Lokalisation im Bereich des vAC und fehlendes nukleäres Signal. In den infizierten Zellen konnten erneut DAPI-positive Signale im vAC gefunden werden. Das pUL48-Verteilungsmuster nach Infektion mit TBUL48-DelC80 oder TBUL48-5LtoA im Vergleich führt zu dem Schluss, dass der Export des Proteins aus dem Kern im Falle der TBUL48-4LtoA-Mutante auf Grund der fehlenden Kernlokalisation funktionsfähig scheint.

### 3.4.5 Die Hemmbarkeit des nukleären Exports in TBUL48-5LtoA

Zur besseren Beurteilung des nukleären Exports von pUL48 wurde ein weiteres Lokalisationsexperiment, mit Hilfe indirekter Immunfluoreszenz, durchgeführt. In diesem Experiment wurde der CRM-1 abhängige Export aus dem Kern durch die Substanz Leptomycin B (LMB) inhibiert. Dabei sollte die intrazelluläre Lokalisation des pUL48 nach Infektion und anschließender Inhibition des Kernexports beobachtet werden. Die Akkumulation von pUL48 im Zellkern WT infizierter Zellen nach Zugabe von LMB war bereits bekannt, wie auch die nukleäre Importsequenz (NLS) [18]. Im Vergleich mit den vorhergehenden Lokalisationsuntersuchungen

ohne LMB lassen sich nun diverse Fragestellungen untersuchen. So können die Hemmbarkeit des nukleären Exports und deren Ausmaß für die verschiedenen Viren miteinander verglichen werden. Indirekt können auch Rückschlüsse auf den Prozess des „nucleocytoplasmic shuttlings“ gezogen werden. Humane Fibroblasten (HFF) wurden wie oben beschrieben ausgesät und infiziert. Vier Stunden vor der Fixierung wurde das Nährmedium durch eine Medium-Leptomycin B- Mischung ersetzt. Die Färbung und Auswertung erfolgten nach demselben Procedere wie bereits beschrieben.

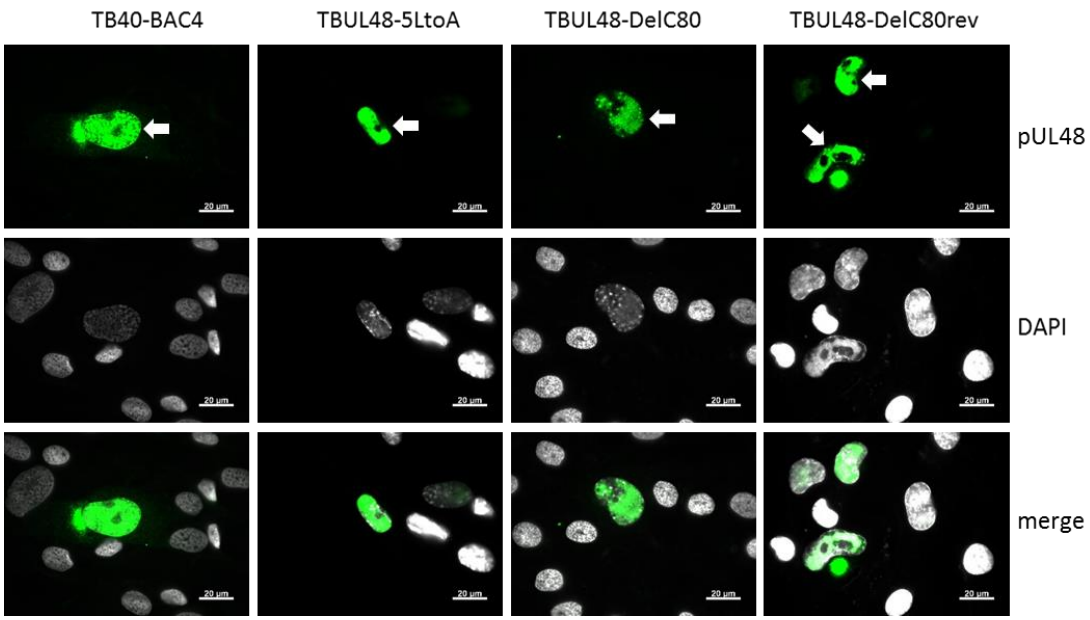



**Abbildung 18 Lokalisation von pUL48 in infizierten humanen Fibroblasten (HFF), nach Zugabe von Leptomycin B (LMB), 5 Tage nach Infektion**

Die Abbildungen zeigen repräsentative Aufnahmen infizierter HFF. Verwendeten Viren sind der Wildtyp, TBUL48-5LtoA, TBUL48-DelC80 und TBUL48-DelC80rev. Am fünften Tag des Experiments wurden die Zellen 30min mit Cycloheximid behandelt und Leptomycin B wurde vier Stunden vor der Fixierung hinzugegeben. pUL48 wurde mit α-pUL48 (grün), hier in der ersten Zeile zu sehen, detektiert. Der Zellkern wurde mit DAPI (weiß), hier mittlere Zeile, dargestellt. Die Pfeile (➡) zeigen das pUL48- Signal im Kern aller infizierter Zellen. Der Maßstabsbalken entspricht 20µm im Original.

Wie in Abbildung 18 gezeigt, wurde pUL48 nach Infektion mit dem Wildtyp und LMB Zugabe im Zellkern detektiert. Das Signal zeigte eine hohe Intensität. Gleichzeitig konnte pUL48 auch partiell im vAC beobachtet werden. Die Analyse der Punktmutante TBUL48-5LtoA ergab im Gegensatz zum vorherigen Experiment

ohne LMB ein klares nukleäres Signal. Im Zytoplasma konnte kein pUL48 mehr detektiert werden. In einigen Fällen konnten wie beim WT schwächere Akkumulationen auch im vAC beobachtet werden. Dieselbe klar überwiegende, nukleäre Lokalisation konnte für die Mutante TBUL48-DelC80 und auch ihre Revertante beobachtet werden. Somit zeigte sich nach Infektion mit allen vier Viren eine veränderte pUL48-Lokalisation mit Verlagerung in den Zellkern. Dadurch konnte die Hemmbarkeit des nukleären Exports in allen vier Fällen bestätigt werden. Die Deletionsmutante TBUL48-DelC80 nimmt hier eine Sonderstellung ein. Durch das nukleäre pUL48-Signal bereits ohne Zugabe von LMB kam es hier anstatt zu einer kompletten Umverteilung lediglich zu einer Zunahme der nukleären Signalintensität.

### 3.4.6 Veränderte Lokalisation der viralen Kapside

Durch die Beobachtung eines DAPI-positiven Signals im vAC nach Infektion mit WT und TBUL48-DelC80rev und das Fehlen dieses Signals nach Infektion mit TBUL48-DelC80 und TBUL48-5LtoA wurde für diese Mutanten eine veränderte Lokalisation der viralen Kapside intrazellulär vermutet. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde in einem weiteren Immunfluoreszenzexperiment das HCMV Tegumentprotein pp150 (pUL32) detektiert, welches als Kapsidmarker dient, da es bereits früh im Replikationszyklus an das Kapsid bindet und eine enge Assoziation dazu aufweist [112, 149]. Zusätzlich wurde durch die Doppelfärbung von pp150 und pUL48 die Lokalisation beider Proteine miteinander verglichen. Humane Fibroblasten wurden wie oben bereits beschrieben ausgesät, infiziert und am fünften Tag post infectionem fixiert. Die Färbung zur Immunfluoreszenzmikroskopie erfolgte mit einem anti-pp150 Primärantikörper.

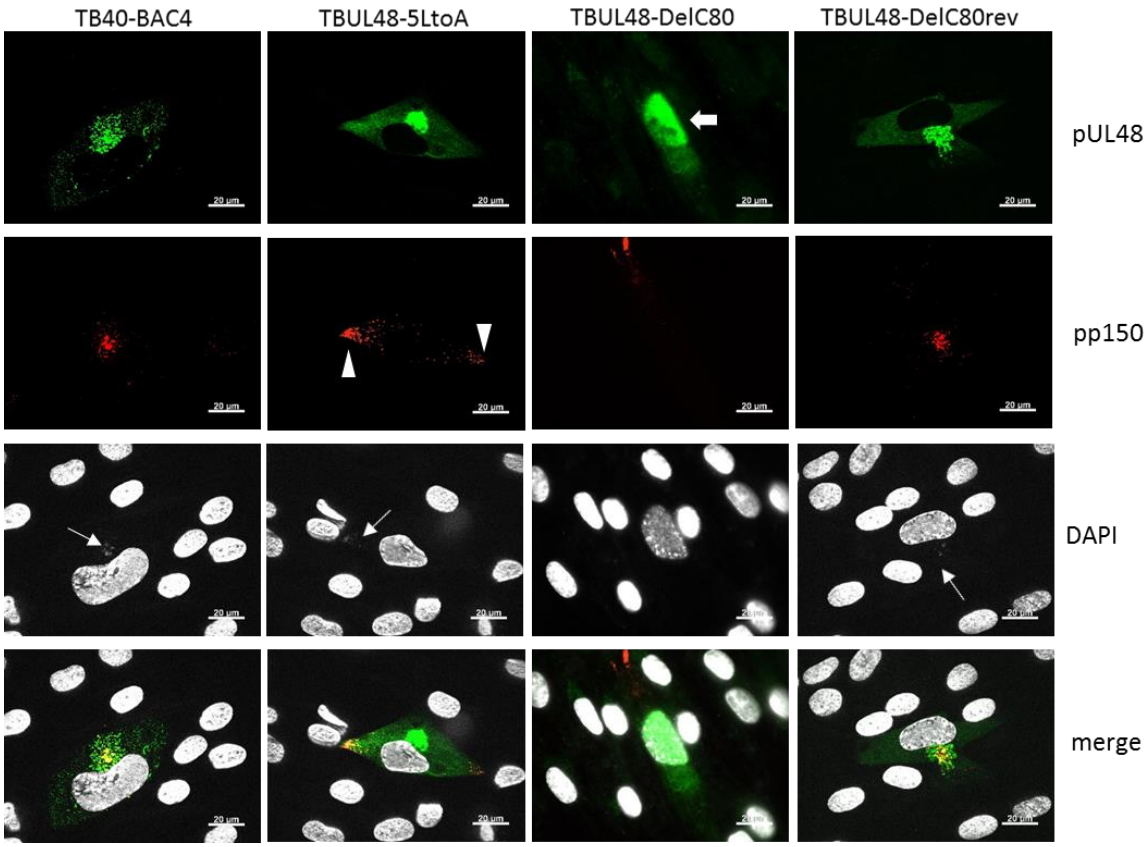



**Abbildung 19 Lokalisation von pUL48 und pp150 (pUL32) in infizierten humanen Fibroblasten (HFF), 5 Tage nach Infektion**

Die Abbildungen zeigen repräsentative Aufnahmen infizierter HFF. Zur Infektion wurden der Wildtyp, TBUL48-5LtoA, TBUL48-DelC80 und TBUL48-DelC80rev verwendet. pUL48 wurde mit α-pUL48 (grün), hier in der ersten Zeile von oben zu sehen, detektiert. pp150 wurde mit anti-pp150 (rot), zweite Zeile, und der Zellkern mit DAPI (weiß), hier dritte Zeile, dargestellt. Der breite Pfeil (➡) zeigt das nukleäre pUL48-Signal bei Infektion mit TBUL48-DelC80. Die Pfeilspitzen (►) zeigen die Kumulation von pp150 in den Zellausläufern der Mutanten. Die dünnen weißen Pfeile (→) zeigen die schwachen extranukleären DAPI-Signale im Kern (Wildtyp und TBUL48-DelC80rev und in der Zellperipherie (TBUL48-5LtoA). Der Maßstabsbalken entspricht 20µm im Original.

Die Abbildung 19 zeigt repräsentative Aufnahmen der im Folgenden besprochenen Ergebnisse. In den mit Wildtypvirus infizierten Fibroblasten zeigte sich erneut die bereits beschriebene Lokalisation des pUL48 im vAC. Für pp150 wurden Signale vor allem perinukleär, im vAC gefunden, welche auch mit DAPI-Signale im Bereich des vACs kolokalisierten. Somit kolokalisierten hier virale DNA, Kapside und pUL48, wie zur Morphogenese neuer Virionen benötigt. Für TBUL48-5LtoA infizierte Zellen ließ sich eine veränderte Lokalisation beobachten. Während sich das Lokalisationsmuster für das Tegumentprotein pUL48 nicht vom Wildtyp unterschied, zeigte sich eine veränderte Verteilung der pp150 Signale. pp150 wurde

hauptsächlich in der Peripherie der Zellen und besonders deutlich in den Zellausläufern detektiert. Es konnte am 5. Tag nur ein sehr schwaches oder kein Signal für pp150 im Bereich des vACs gefunden werden. Es wurde somit eine veränderte Lokalisation von pp150 (stellvertretend für die Lokalisation der Kapside) in TBUL48-5LtoA infizierten Zellen gefunden. In den meisten Zellen wurden auch DAPI-positive Signale in den Ausläufern beobachtet. Die gemeinsame Lokalisation von pp150 und DAPI-Signalen lässt auf die Akkumulation DNA-gefüllter viraler Kapside in der Zellperipherie schließen. Im Gegensatz zum Wildtypvirus kann keine Kolokalisation dieser Kapside mit pUL48 gefunden werden. Daraus folgerten wir eine veränderte Kapsidlokalisation für TBUL48-5LtoA.

Die Referenzmutante TBUL48-DelC80 zeigte ebenfalls dieselben Veränderungen wie für TBUL48-5LtoA beschrieben, pp150 und DAPI-Signale in der Peripherie (DAPI in den Zellausläufern in dieser Abbildung nicht sichtbar). Es zeigte sich auch keine Kolokalisation mit pUL48, da dieses überwiegend im Nukleus zu finden war. Die mit TBUL48-DelC80rev infizierten Zellen wiesen sowohl für pUL48 als auch für pp150 und DAPI dieselben Lokalisationsmuster auf, wie im Wildtyp bereits beobachtet wurden. Schlussfolgernd konnte eine veränderte Lokalisation der viralen Kapside nach Infektion mit den Mutantenviren gezeigt werden. Weiter konnte beobachtet werden, dass im Gegensatz zum Wildtypvirus und der Revertante keine Kolokalisation von pUL48 und Kapsiden mehr vorliegt. Diese Kombination deutet auf einen Defekt bei der Interaktion von pUL48 mit dem Kapsid hin.

### 3.4.7 Ultrastrukturelle Analyse

Um die Ultrastruktur der viralen Partikel der TBUL48-5LtoA-Mutante beurteilen zu können, wurden infizierte Fibroblasten mittels Elektronenmikroskopie untersucht. Diese Methode erlaubt die direkte Strukturanalyse von Viruspartikeln, ohne Spezifizierung bestimmter Proteine. Besonderes Augenmerk lag auf dem Aufbau der Kapside und ihrer intrazellulären Verteilung. Unterschieden wurde nach Kapsiden im Nukleus und im *Assembly Complex* (vAC). Auch in diesem Experiment wurden der Wildtyp TB40-BAC4, die Deletionsmutante TBUL48-DelC80 sowie die dazugehörige Revertante TBUL48-DelC80rev mitbetrachtet.

Die humanen Fibroblasten (HFF) wurden auf Kohlenstoff beschichtete Saffirdisks ausgesät und mit einer berechneten MOI von ca. eins infiziert. Nach fünf Tagen erfolgte die Fixierung durch Hochdruckeinfrieren und Gefriersubstitution. Von den infizierten Zellen wurden Ultradünnschnitte angefertigt, welche anschließend mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie ausgewertet wurden. In Abbildung 20 sind repräsentative Aufnahmen verschiedener Zellbereiche gezeigt.

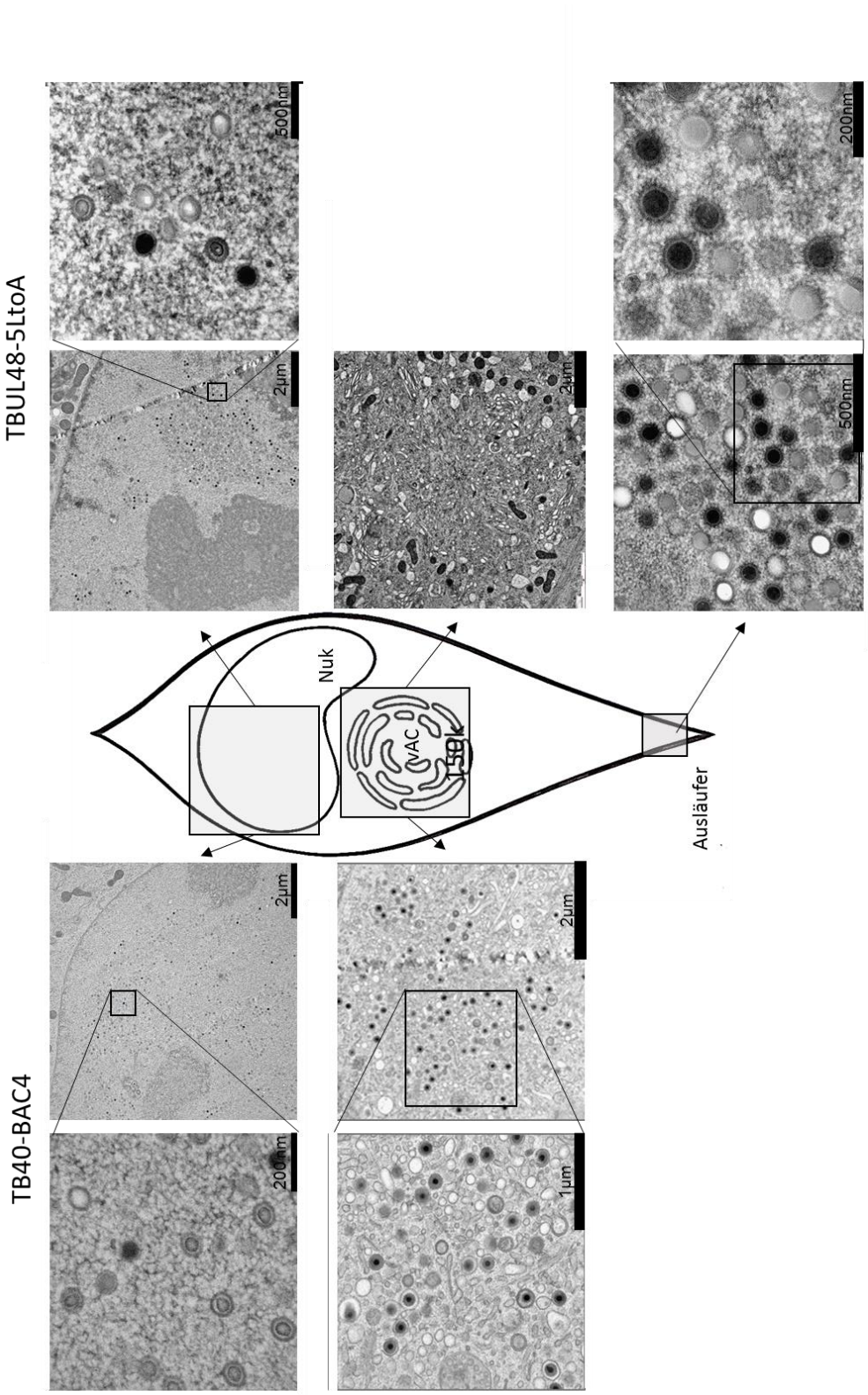



**Abbildung 20 Ultrastrukturelle Aufnahmen infizierter Humaner Fibroblasten (HFF). Die Abbildung zeigt gegenüberstellend repräsentative Bildausschnitte der Elektronenmikroskopie nach Infektion mit Wildtypvirus (TB40-BAC4) und TBUL48-5LtoA.**

Die Proben wurden 5 Tage nach Infektion kryofixiert. Die Lokalisation der Bilder intrazellulär wird anhand der schematischen Darstellung einer virusinfizierten Zelle deutlich gemacht, Nuk steht für Nukleus, vAC für den viral Assembly Complex. Bilder des Wildtyps freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Clarissa Villinger.

Die Zellen, die mit TB40-BAC4-Virus infiziert wurden, zeigten am 5. Tag nach Infektion Viruskapside sowohl im Kern als auch im vAC. In beiden Kompartimenten konnten alle drei Arten von Kapsiden beobachtet werden. Virale Kapside werden nach ihrer Zusammensetzung in A-, B- oder C-Kapside unterteilt. Als A-Kapside werden sogenannte „leere“ Kapside bezeichnet, sie enthalten weder DNA noch Strukturkomponenten. Sie entstehen bei fehlerhafter DNA-Verpackung. B-Kapside enthalten ebenfalls keine DNA, beinhalten allerdings Proteine, die als Gerüst für die Kapsidkomponenten dienen. B-Kapside reifen zu C-Kapsiden, welche virale DNA enthalten [55, 95, 136]. Die Kapsidunterarten wurden bei der Auswertung des Experiments nicht quantifiziert. In den Zellausläufern konnten für das Wildtypvirus keine Kapside gefunden werden. Die mit TBUL48-5LtoA infizierten Zellen zeigten im Kern eine ähnliche Verteilung der Viruskapsiden wie bereits für TB40-BAC4 beobachtet. Es wurden A-, B- und C-Kapside gesehen. Im perinukleären vAC konnten nach der TBUL48-5LtoA-Infektion aber keine oder nur vereinzelte Kapside gefunden werden. Dies ist ein wichtiger Unterschied zum Wildtyp-Virus. Dafür konnten im Gegensatz zu TB40-BAC4 in den peripheren Zellausläufern deutliche Akkumulationen von Kapsiden (A-, B- und C-Kapside) gefunden werden. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen der Immunfluoreszenz überein, in welcher wir DAPI- und pp150-Signale (als Kapsidmarker) in den Zellausläufern finden konnten. Damit stützt die ultrastrukturelle Analyse die Theorie einer veränderten Kapsidlokalisation für die TBUL48-5LtoA-Mutante.

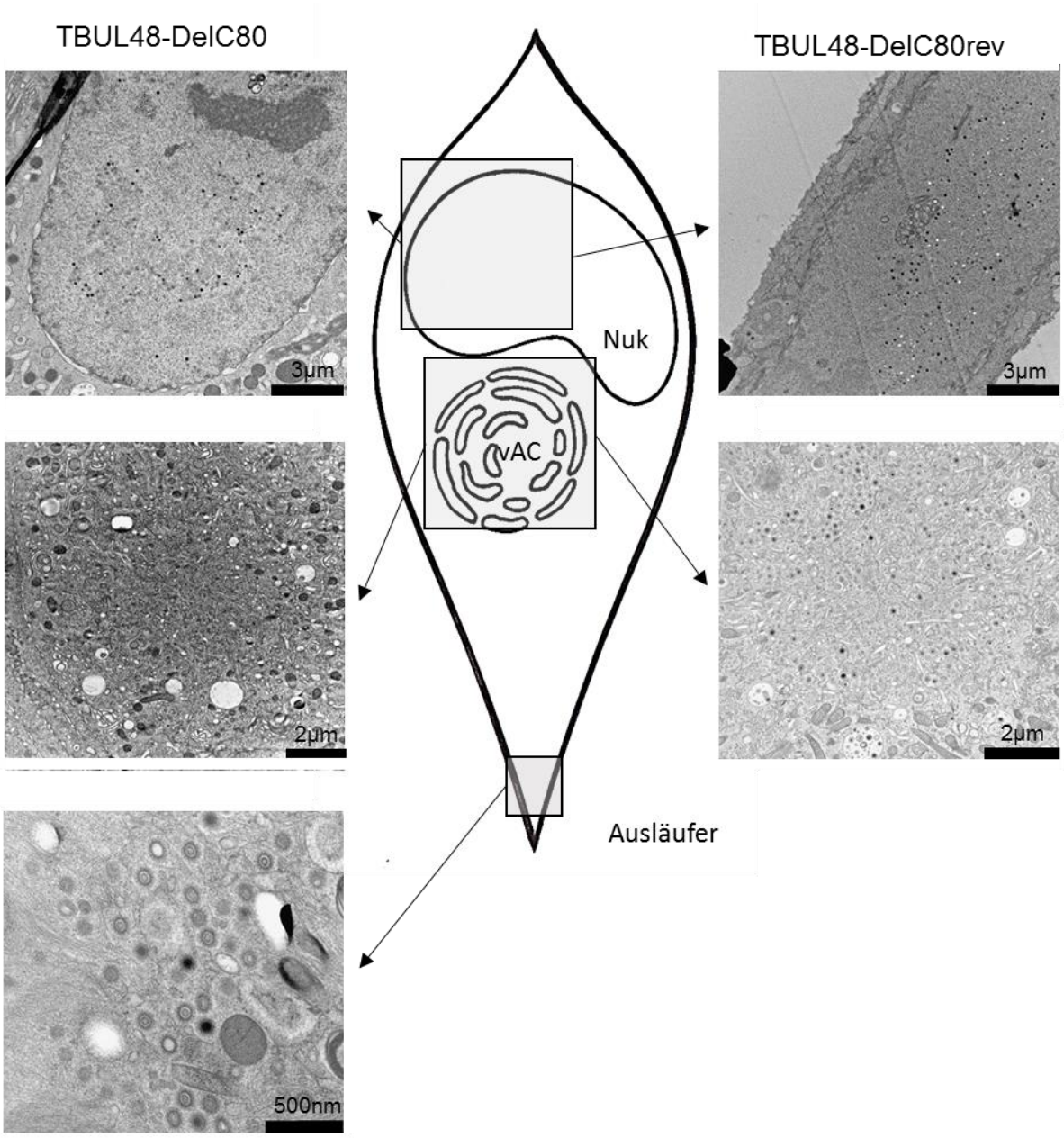



**Abbildung 21 Ultrastrukturelle Aufnahmen infizierter humaner Fibroblasten (HFF)**

Die Abbildung zeigt gegenüberstellend repräsentative Bildausschnitte der Elektronenmikroskopie. HFF (Human foreskin fibroblasts) wurden mit den Virusstämmen TBUL48-DelC80 und TBUL48-DelC80rev infiziert. Die Kryofixierung der Proben erfolgte 5 Tage nach Infektion. Die Lokalisation der einzelnen Bilder intrazellulär wird anhand der schematischen Darstellung einer virusinfizierten Zelle deutlich gemacht, Nuk steht für Nukleus und vAC für den viral Assembly Complex.

Die Infektion mit der Deletionsmutante (TBUL48-DelC80) ergab denselben Phänotyp wie bereits die TBUL48-5LtoA Mutante. Es fanden sich alle Kapsidunterarten im Zellkern, aber keine Kapside im vAC. Auch für diese Mutante konnten klar erkennbare Akkumulationen viraler Kapside in den Zellausläufern

gefunden werden (Abbildung 21). Die Aufnahmen nach Infektion mit der Revertante TBUL48-DelC80rev glichen, wie auch in allen anderen Experimenten, ultrastukturell denen des Wildtypvirus. Es konnten Kapside im Kern und vAC, nicht aber in den Zellausläufern gefunden werden (Abbildung 21).

Dieses Ergebnis passt sehr gut zu den Lokalisationsstudien mittels Immunfluoreszenz und bestätigt die veränderte Lokalisation der viralen Kapside intrazellulär nach Infektion mit den Mutantenviren TBUL48-DelC80 und TBUL48-5LtoA.

## 3.5 Generierung einer neuen Virusmutante: die TBUL48-DelC28 Mutante

Die Charakterisierung der TBUL48-5LtoA Punktmutante ergab trotz positiver Prädiktion keine Hinweise auf eine Beeinträchtigung des nukleären Exports von pUL48. Da aber die Infektion mit der Deletionsmutante TBUL48-DelC80 in den Lokalisationsstudien eine deutliche Kumulation von pUL48 im Zellkern zeigt, scheint eine NES in diesen 80As trotz allem sehr wahrscheinlich. Auf Grund dieser Beobachtungen wurde der C-Terminus einer erneuten intensiven Analyse auf mögliche „Nukleäre Export Sequenzen“ (NES) unterzogen. Dafür nutzten wir den NetNES 1.1 Server (Abbildung 22).

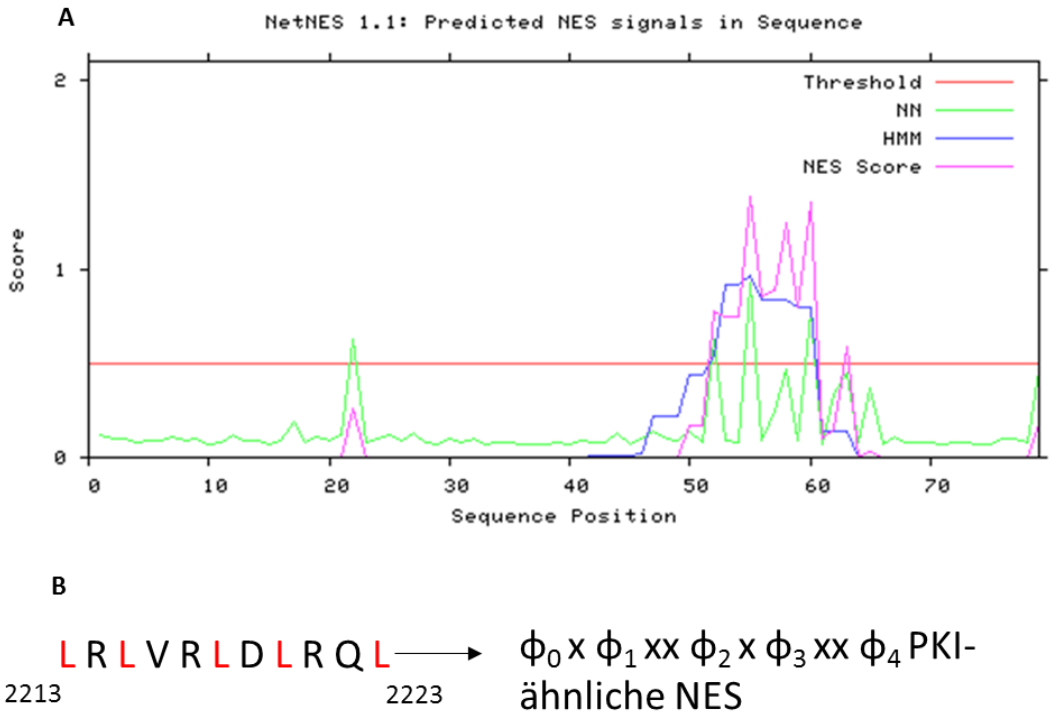



**Abbildung 22 NES (Nukleäre Export Sequenz)-Prädiktion der 80 C-terminalen Aminosäuren von pUL48**

**A** zeigt die graphische Darstellung der NetNES 1.1 Analyse der C-terminalen 80 Aminosäuren (AS) des Tegumentproteins pUL48. Die Graphik stellt in rosa die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer NES in Bezug zur Position der einzelnen AS dar. AS Nummer 1 in der Grafik entspricht der AS 2161 des Proteins und As Nummer der Grafik 80 der AS 2241 des Proteins.

**B** zeigt die kalkulierte NES-Sequenz. In rot die fünf hydrophoben Aminosäuren an den Positionen 2213, 2215, 2218, 2220 und 2223. Daneben die abstrahierte Konsensussequenz der sogenannten PKI-like (Protein Kinase A-Inhibitor-like) NES. Φ steht für die Positionen der hydrophoben Aminosäuren, x für die variablen Aminosäuren dazwischen.

Wie schon bei früheren Analysen, wurde eine mögliche NES innerhalb der 28 C-terminalen Aminosäuren des Proteins vorhergesagt (siehe Abbildung 22). Der kritische Bereich betraf die Aminosäuren 2213 bis 2223. Für diese prädiktive Sequenz ergab sich eine hohe Wahrscheinlichkeit einer sogenannte PKI-like NES [60]. Um die Relevanz des C-terminalen Bereiches für den Prozess des nukleären Exports von pUL48 nochmals zu prüfen, wurde daraufhin eine Virusmutante mit Deletion der terminalen 28 Aminosäuren generiert. Dies erfolgte mittels BAC-Mutagenese (siehe Material und Methoden). Nach erfolgreicher Klonierung und Selektion wurde die gewünschte Mutation in den Klonen der BAC-Mutante durch Sequenzierung überprüft. Schlussendlich wurde die neue BAC-DNA durch Elektroporation, zusammen mit einem komplementierenden Plasmid, welches die vollständige pUL48-Sequenz beinhaltete, in MRC-5 eingebracht. Anschließend wurde die Virusmutante unter komplementierenden Bedingungen rekonstituiert (siehe Material und Methoden). Innerhalb von vier Wochen konnte der Virusstock mit einem Titer von 1,4x $10^3$ Viruspartikeln/ml generiert werden. Diese Virusmutante erhielt, angelehnt an die Nomenklatur der bisherigen Mutanten, den Namen TBUL48-DelC28.

## 3.6 Charakterisierung der TBUL48-DelC28 Mutante

### 3.6.1 Beeinträchtigte Zell-zu-Zell Ausbreitung

Der Focus-Expansion-Assay sollte zeigen, ob auch die Deletion der C-terminalen 28 AS zu einer ähnlichen Einschränkung der Virusausbreitung führt, wie bereits für die TBUL48-5LtoA-Mutante gezeigt werden konnte. Um eine Vergleichbarkeit der Experimente zu gewährleisten, wurde der Assay unter denselben Bedingungen durchgeführt wie mit TBUL48-5LtoA. Als Kontrolle wurden TB40-BAC4 als Wildtypvirus und die Deletionsmutante TBUL48-DelC80 als Referenz mitgeführt.

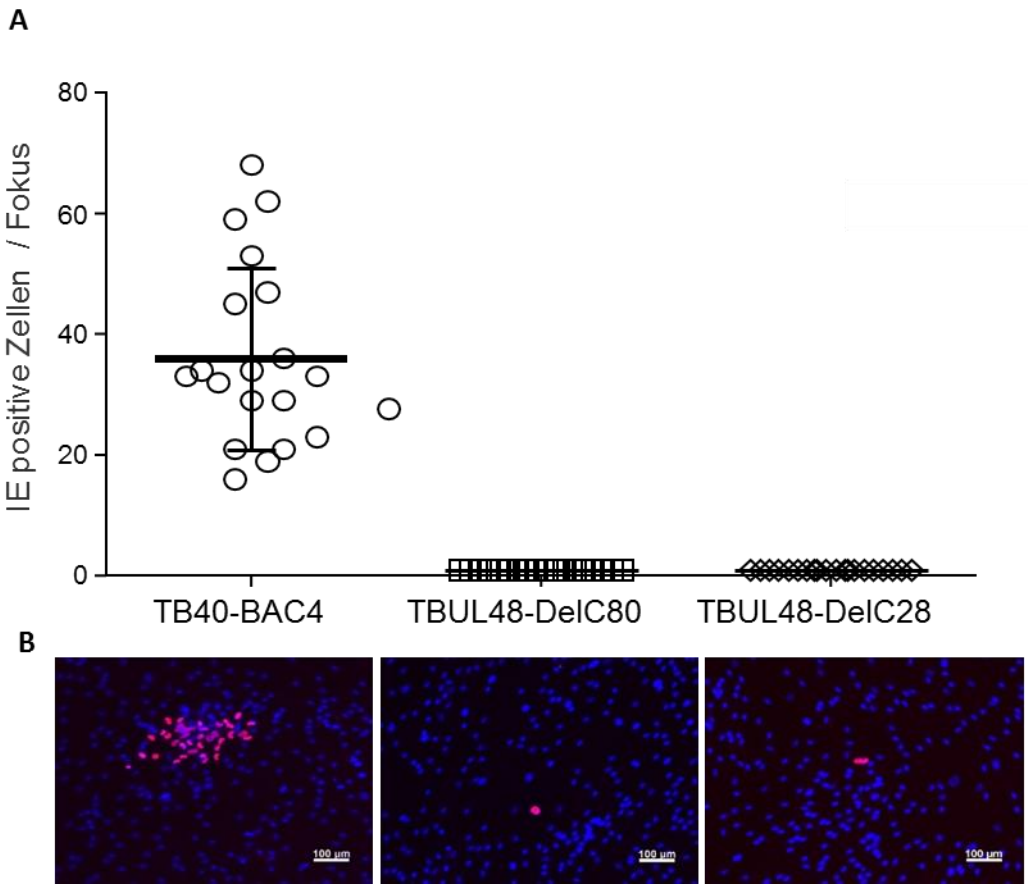



**Abbildung 23 Fokus-Expansion-Assay: Infizierte Humane Fibroblasten (HFF) pro Fokus, 7 Tage nach Infektion**

HFF wurden mit dem Wildtypvirus, TB-UL48-DelC80 und der neu generierten Deletionsmutante TBUL48-DelC28, mit je einer MOI (Multiplicity of infection) von 0,06 für 24 Stunden, infiziert, anschließend mit einer Gamunex-Medium-Mischung für 6 Tage inkubiert. 7 Tage nach Infektion wurde das Experiment durch Fixierung beendet **A** Jeder Datenpunkt im Diagramm zeigt die Anzahl IE (Immediate-early) -positiver Zellen pro Fokus. Für jedes Virus sind zusätzlich der Median (breiter Querbalken) und die Standardabweichung (Längsbalken) dargestellt.

**B** Die Bilder stellen repräsentative Aufnahmen der infizierten Zellen nach Fixierung an Tag 7 dar. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI (blau) und die Färbung infizierter Zellen mit anti-immediate early (rot). Zu erkennen ist die Anzahl infizierter Zellen pro Fokus. Der Maßstabsbalken entspricht 100µm im Original.

Wie in Abbildung 23 dargestellt, bildeten die mit Wildtypvirus infizierten Zellen nach 7 Tagen deutlich erkennbare Plaques. Im Mittel bestand ein Plaque aus 35 infizierten (IE-positive) Zellen. Die neu generierte Deletionsmutante TBUL48-DelC28 zeigte ausschließlich einzelne, infizierte Zellen, ohne Infektion der benachbarten HFF. Es bildeten sich hier folglich keine Plaques. Fehlende

Plaquebildung bestätigte sich in diesem Experiment auch für die TBUL48-DelC80-Mutante erneut.

### 3.6.2 Verändertes Wachstumsverhalten der TBUL48-DelC28 Mutante

Zur Charakterisierung des Wachstumsverhaltens dieser Mutante wurde in Anlehnung an die vorhergehenden Ergebnisse der TBUL48-5LtoA-Charakterisierung eine „Low-MOI“ Wachstumskinetik durchgeführt. Der Beobachtungszeitraum betrug 18 Tage, die Bedingungen entsprachen der vorhergehenden Kinetik (siehe Charakterisierung TBUL48-5LtoA). Um eine gute Vergleichbarkeit herzustellen, wurden der Wildtyp und TBUL48-DelC80 erneut mitbetrachtet. Die MOI der initialen Infektion betrug für diesen Versuch ca. 0,045.

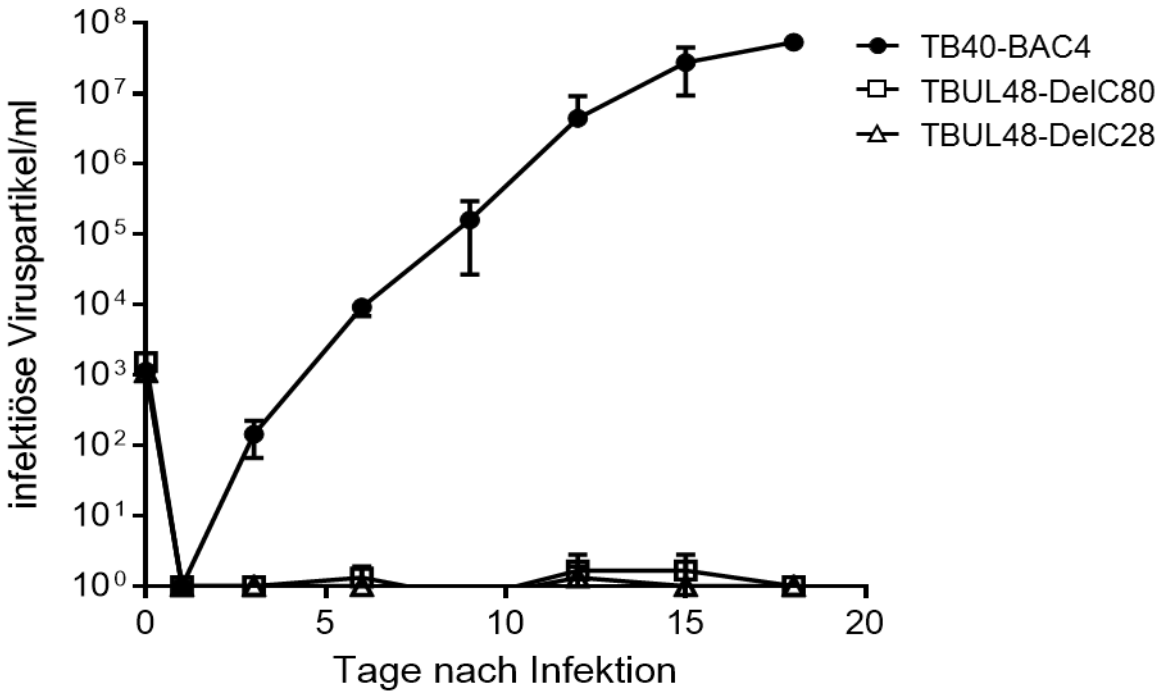



**Abbildung 24: Auswirkungen der Deletion von 28 Aminosäuren im C-terminalen Bereich des Tegumentproteins pUL48 auf die Bildung und Freisetzung infektiöser Viruspartikel.**

HFF (Human foreskin fibroblasts) wurden mit dem Wildtyp und den Mutanten TBUL48-DelC80 und TBUL48-DelC28, mit einer MOI (Multiplicity of infection) von jeweils 0,045, infiziert. Die Überstände infizierter Zellen wurden am ersten Tag nach Infektion und anschließend im Abstand von jeweils drei Tagen geerntet. Die Menge an freigesetzten infektiösen Viruspartikeln wurde durch unmittelbare Titration bestimmt. Die Kurven

stellen die Menge der Viruspartikel pro ml Überstand logarithmisch zum jeweiligen Zeitpunkt dar. Die Abbildung zeigt den Mittelwert der erhobenen Mengen und die jeweilige Standardabweichung.

Das Wildtypvirus zeigte erneut einen steilen Anstieg in den Überstand freigesetzter Virionen. Der maximal erreichte Titer betrug an Tag 18 $5\times10^7$ infektiöse Partikel/ ml (Abbildung 24). Die Deletionsmutante TBUL48-DelC28 wies über den gesamten Beobachtungszeitraum keinen relevanten Anstieg der freigesetzten Viruspartikel auf. Die absolute Menge ausgezählter infektiöser Partikel schwankte im Rahmen von 0-2 pro ml. Somit konnte keine relevante Freisetzung infektiöser Virionen für dieser Virusmutante beobachtet werden (Abbildung 24). Auch das Freisetzungsverhalten der TBUL48-DelC80-Mutante zeigte erneut keine relevante Freisetzung und glich somit den vorausgegangenen Ergebnissen.

### 3.6.3 Lokalisation des Tegumentproteins pUL48

Die Generierung der TBUL48-DelC28- Mutante diente dem Ziel die vorhergesagte NES im Tegumentprotein pUL48 zu überprüfen. Deswegen kam der Immunfluoreszenzmikroskopie zur Lokalisationsbestimmtung des Proteins besondere Bedeutung zu. Bei tatsächlicher Beeinträchtigung des nukleären Egress durch die Deletion erwarteten wir eine Akkumulation von pUL48 im Zellkern.

Dafür wurden HFF mit einer MOI von 0,5 infiziert, nach fünf Tagen fixiert und die gewünschten Proteine mit spezifischen Antikörpern detektiert (siehe Material und Methoden). Zum direkten Vergleich wurden der Wildtyp und die Mutanten TBUL48-DelC80 und TBUL48-5LtoA mitbetrachtet. Besonderes Augenmerk lag nun auf den spezifischen Unterschieden der pUL48-Lokalisation nach Infektion mit den verschiedenen Viren.

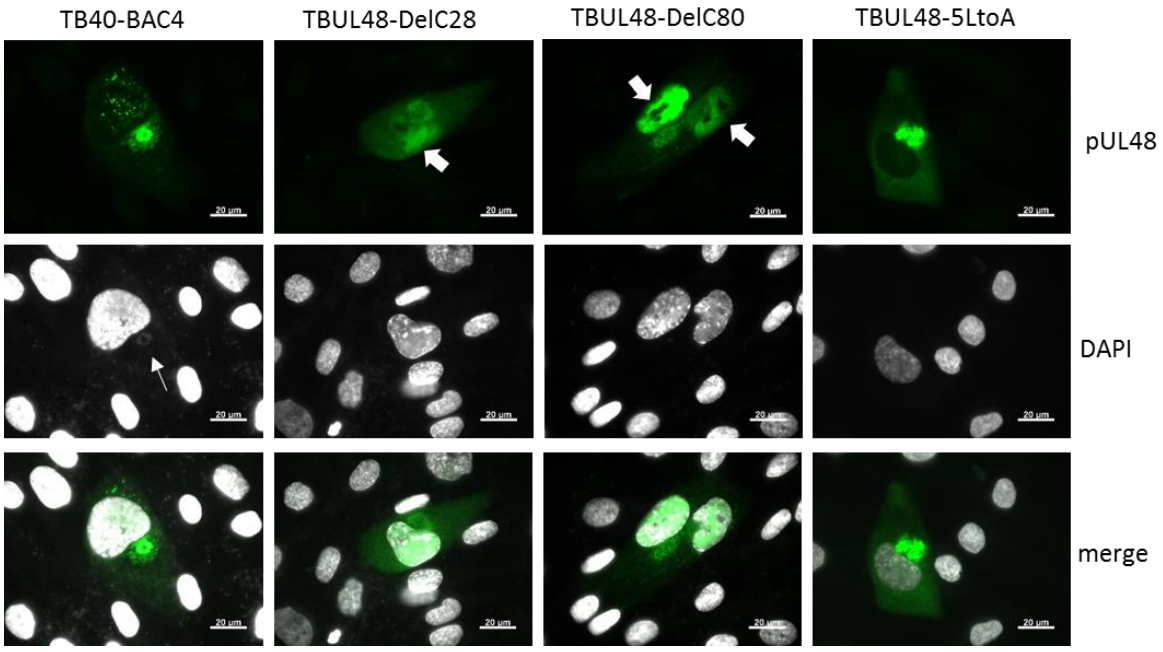



**Abbildung 25 Lokalisation von pUL48 in infizierten humanen Fibroblasten (HFF), 5 Tage nach Infektion**

Die Abbildungen zeigen repräsentative Aufnahmen von infizierten HFF. Die verwendeten Viren sind der Wildtyp, TBUL48-DelC28, TBUL48-DelC80 und TBUL48-5LtoA. Fünf Tage nach Infektion wurden die Zellen fixiert und pUL48 mit α-pUL48 (grün), hier in der ersten Zeile, detektiert. Der Zellkern wurde mit DAPI (weiß), hier mittlere Zeile, dargestellt. Der dünne weiße Pfeil (⟶) deutet auf die DAPI-Akkumulationen im vAC (viral Assembly Complex) nach Infektion mit dem Wildtyp. Die breiten weißen Pfeile (➡) zeigen das nukleäre pUL48-Signal nach Infektion mit den Deletionsmutanten. Der Maßstabsbalken markiert 20µm im Original.

In den mit TBUL48-DelC28 infizierten Zellen konnte am 5. Tag nach Infektion einerseits ein über das gesamte Zytoplasma verteiltes pUL48-Signal gefunden werden (siehe Abbildung 25). Andererseits zeigten sich prominente Signale im Bereich des Zellkerns und des vAC. Das nukleäre Signal war im Vergleich zu dem des Wildtypvirus und des TBUL48-5LtoA-Virus deutlich ausgeprägter. Im direkten Vergleich mit der Deletionsmutante TBUL48-DelC80 wirkte es aber weniger intensiv. Wie bereits für die anderen untersuchten Mutanten gezeigt wurde, konnten auch nach Infektion mit TBUL48-DelC28 keine DAPI- Akkumulationen im vAC festgestellt werden.

### 3.6.4 Bestehende Hemmbarkeit des nukleären Exports von pUL48

Das partielle nukleäre Verteilungsmuster von pUL48 nach Infektion mit TBUL48-DelC28 führte zu der Frage, ob der nukleäre Export durch die erfolgte Deletion beeinträchtigt wurde. Die Hemmbarkeit des nukleären Exports sollte folglich durch die Zugabe von LMB untersucht und der dabei entstehende Phänotyp ermittelt werden. Die Versuchsbedingungen und die MOI glichen dem bereits beschriebenen Experiment unter Zugabe von LMB (siehe Charakterisierung der TBUL48-5LtoA-Mutante).

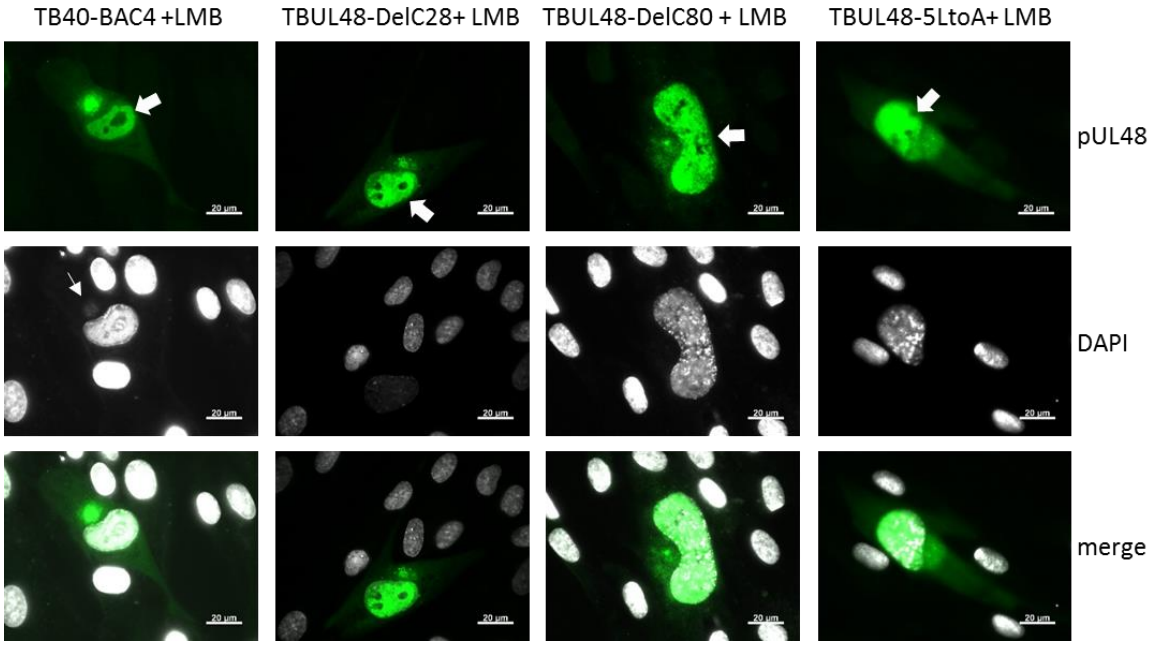



**Abbildung 26 Lokalisation von pUL48 in infizierten humanen Fibroblasten (HFF), nach Zugabe von Leptomycin B (LMB), 5 Tage nach Infektion**

Die Abbildungen zeigen repräsentative Aufnahmen infizierter HFF. Die verwendeten Viren sind der Wildtyp, TBUL48-DelC28, TBUL48-DelC80 und TBUL48-5LtoA. Am fünften Tag des Experiments wurde vor der Fixierung die Proteinsynthese mit Cycloheximid gehemmt und mit LMB behandelt (vier Stunden).pUL48 wurde mit α-pUL48 (grün), hier in der ersten Zeile, detektiert. Der Zellkern wurde mit DAPI (weiß), hier mittlere Zeile, dargestellt. Der dünne weiße Pfeil ( ⟶ ) deutet auf die DAPI-Akkumulationen im vAC (viral Assembly Complex) nach Infektion mit dem Wildtyp. Die breiten weißen Pfeile ( ➡ ) zeigen das nukleäre pUL48-Signal nach LMB-Zugabe. Der Maßstabsbalken markiert 20µm des Originals.

Abbildung 26 zeigt repräsentative Aufnahmen der pUL48-Verteilung nach Infektion mit den verschiedenen Viren, welche im Folgenden weiter ausgeführt werden. Für die Beschreibung des Phänotyps der Referenz- und Kontrollvirenstämme nach

LMB-Einwirkung siehe Abschnitt Charakterisierung der TBUL48-5LtoA-Mutante: Der nukleäre Export von pUL48.

Für die Infektion mit der Deletionsmutante TBUL48-DelC28 konnte nach Behandlung mit LMB weiterhin ein schwaches zytoplasmatisches pUL48- Signal erkannt werden. Im vAC zeigte sich ebenfalls ein intensives Signal, das klar vom zytoplasmatischen abgegrenzt werden konnte. Das pUL48-Signal der höchsten Intensität wurde aber im Zellkern detektiert. Der Vergleich mit dem vorhergehenden Immunfluoreszenzexperiment ohne Zugabe von LMB ergab in Bezug auf das nukleäre pUL48-Signal eine merkliche Intensitätszunahme durch die erfolgte LMB-Behandlung. Der durch LMB erzielte Effekt kam beim Wildtyp und der TBUL48-5LtoA-Mutante am deutlichsten zum Tragen, da ohne die Zugabe von LMB kein pUL48 im Kern gefunden werden konnte. Der beschriebene Effekt konnte für die Deletionsmutanten nicht in diesem Ausmaß beobachtet werden, da sich der größte Anteil des Proteins bereits vor der Zugabe von LMB im Kern befand. Hier konnte allerdings weiter differenziert werden. LMB führte bei Deletion der finalen 28As zu einem stärkeren Effekt als bei Deletion der gesamten 80As. Der nukleäre Export durch CRM-1 scheint somit durch die Deletion der 28As weniger beeinträchtigt als durch die Deletion der 80As.

### 3.6.5 Divergente Kapsidlokalisation nach Infektion mit TBUL48-DelC28

In den Immunfluoreszenzaufnahmen konnten für das Wildtypvirus erneut DAPI Signale im Bereich des vAC beobachtet werden, welche in der TBUL48-DelC28-Mutante zu fehlen schienen. Folglich sollte auch hier die Lokalisation des viralen Kapsids mit Hilfe des anti-pp150 Primärantikörpers bestimmt werden. Die experimentellen Bedingungen glichen wieder den bereits aufgeführten.

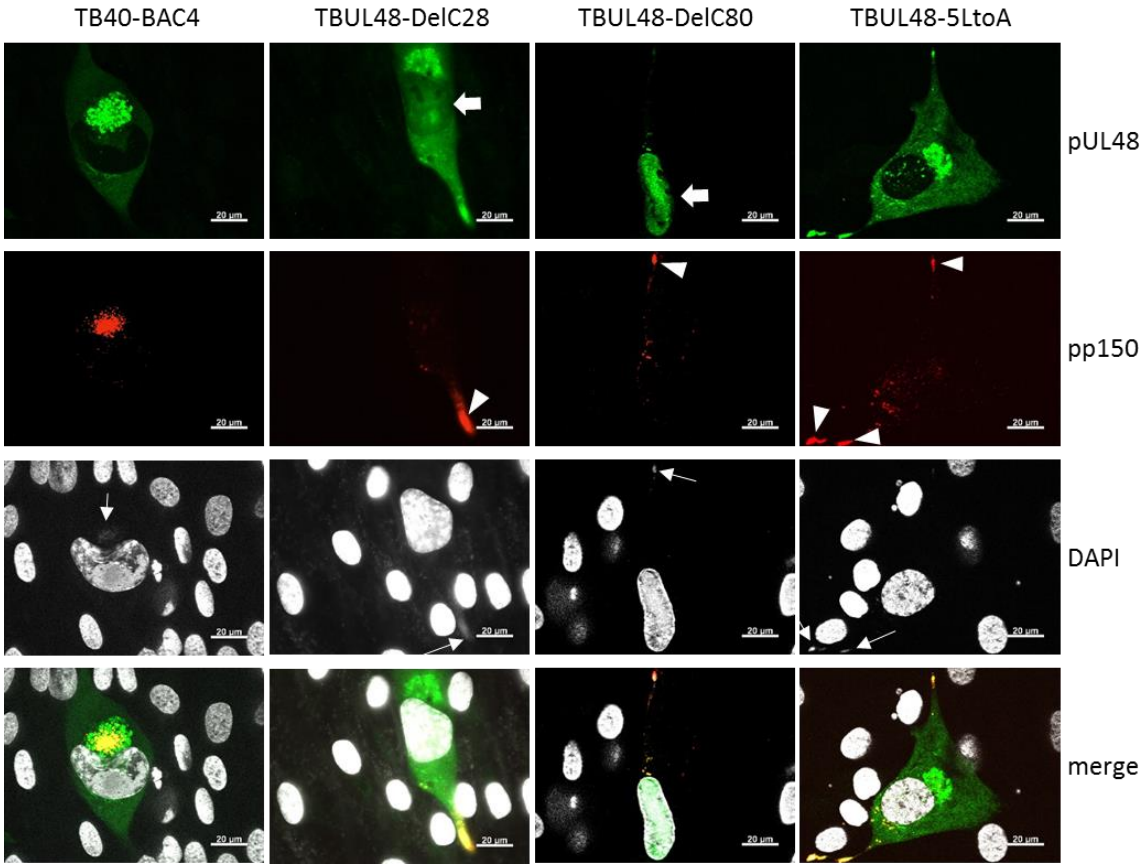



**Abbildung 27 Lokalisation von pUL48 und pp150 (pUL32) in infizierten humanen Fibroblasten (HFF), 5 Tage nach Infektion**

Die Abbildungen zeigen repräsentative Aufnahmen infizierter HFF. Verwendet wurden der Wildtyp TB40-BAC4, TBUL48-DelC28, TBUL48-DelC80 und TBUL48-5LtoA. pUL48 wurde mit α-pUL48 (grün), hier in der ersten Zeile, detektiert. pp150 wurde mit anti-pp150 (rot), zweite Zeile, und der Zellkern mit DAPI (weiß), hier dritte Zeile, dargestellt. Die dünnen weißen Pfeile (⟶) zeigen auf DAPI-Akkumulationen im Nukleus (Wildtypviurs) und in der Peripherie. Die Pfeilspitzen (➤) deuten auf die pp150-Akkumulationen in den Zellausläufern der Mutanten. Die breiten weißen Pfeile ( ➡) zeigen das nukleäre pUL48-Signal der Deletionsmutanten. Der Maßstabsbalken entspricht 20µm im Original.

In den mit TBUL48-DelC28 infizierten HFF zeigte sich die bereits bekannte, partiell nukleäre Lokalisation von pUL48 (siehe Abbildung 27). Das Verteilungsmuster von pp150 unterschied sich von dem des Wildtyps, es zeigten sich ausschließlich in der Zellperipherie pp150-positive Signale, vornehmlich den Zellausläufern. Im vAC konnte kein pp150 detektiert werden. Die Betrachtung der DAPI-Signale ergab eine ähnliche Verteilung. Im Gegensatz zum Wildtyp konnte kein DAPI im vAC detektiert werden. In der Zellperipherie fanden sich aber schwache DAPI-positive Signale. Die Kolokalisation von pp150 und DAPI in den Zellausläufern, nicht aber im vAC lässt auch für die TBUL48-DelC28-Mutante auf eine veränderte Lokalisation der viralen Kapside in der Zelle schließen. Dieselben Beobachtungen ließen sich erneut bei Deletion der finalen 80As und den Punktmutationen im leucinreichen Bereich des C-Terminus machen.

## 3.7 pUL48- Ausbreitung ohne Infektion ?

Während den verschiedenen Lokalisationsstudien wurde eine interessante Beobachtung nach Infektion mit den verschiedenen Virenmutanten gemacht. Sie betraf die Zell-zu-Zell-Ausbreitung von pUL48.

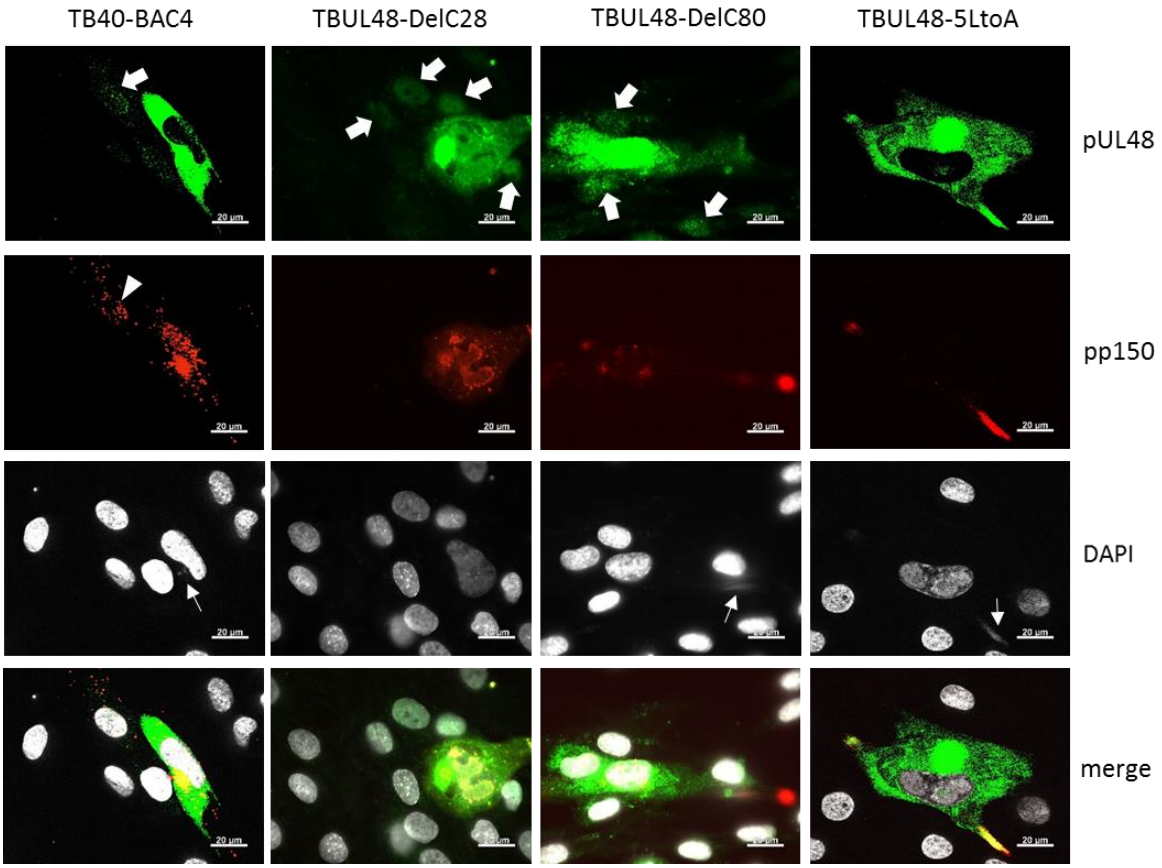



**Abbildung 28 Lokalisation von pUL48 und pp150 (pUL32) in benachbarten Zellen der primär infizierten humanen Fibroblasten (HFF), 5 Tage nach Infektion**

Die Abbildungen zeigen repräsentative Aufnahmen infizierter HFF. Verwendet wurden der Wildtyp, TB40-BAC4, TBUL48-DelC28, TBUL48-DelC80 und TBUL48-5LtoA. pUL48 wurde mit α-pUL48 (grün), hier in der ersten Zeile, detektiert. pp150 wurde mit anti-pp150 (rot), zweite Zeile, und der Zellkern mit DAPI (weiß), hier dritte Zeile, dargestellt. Die Intensität des pUL48-Signals wurde stark hochgezogen um die Sichtbarkeit benachbarter Kerne zu verbessern. Die dünnen weißen Pfeile (⟶) deuten auf DAPI-Akkumulation im vAC (viral Assembly Complex) oder den Zellausläufern. Die breiten weißen Pfeile (➡) markieren sekundär pUL48-positive Zellkerne. Die Pfeilspitze (▶) zeigt auf den pp150-positiven sekundär infizierten Zellkern (Wildtyp). Der Maßstabsbalken entspricht 20µm im Original.

Bei der Auswertung der Immunfluoreszenzversuche infizierter Zellen ohne die Zugabe von LMB ließen sich bereits einige interessante Beobachtungen machen. Nach Infektion mit dem Wildtyp konnten gelegentlich benachbarte Zellen in frühen Phasen der Infektion beobachtet werden. Diese zur primär infizierten Zelle direkt

benachbarten HFF zeigten in diesen Fällen sowohl pp150 als auch pUL48-positive Zellkerne. Beide Signale stellten sich nur schwach dar und betrafen allein den Nukleus (Abbildung 28). Dieses Verteilungsmuster passt gut zu einer sekundären Infektion, einer Infektion, die von der primär infizierten Zelle ausgeht. Bei Betrachtung der Experimente mit TBUL48-DelC28 fielen ebenfalls zur primär infizierten Zelle direkt benachbarte pUL48-positive Zellkerne auf. Sie stellten sich jedoch pp150-negativ dar. Dieselbe Beobachtung ließ unter erneuter Analyse auch für die TBUL48-DelC80-Mutante machen. Auch hier fanden sich für ca. jede 5. primär-infizierte Zelle benachbarte, ausschließlich pUL48-positive Zellkerne. Bei der folgenden Reevaluation der mit TBUL48-5LtoA infizierten HFF konnten keine auffälligen benachbarten Zellkerne beobachtet werden. Im folgenden Schritt wurden auch die durchgeführten LMB-Experimente erneut unter diesem Gesichtspunkt betrachtet. Vorteil war hier, dass benachbarte Zellen durch ein konzentriertes pUL48-Signal im Nukleus leichter zu identifizieren waren (Abbildung 28). Dabei wurde berücksichtigt, dass die für TBUL48-5LtoA fehlenden pUL48-Signale benachbarter Kerne möglicherweise durch einen bestehenden, funktionsfähigen nukleären Export erklärbar sind. Durch LMB kann es trotzdem zur Konzentration des gesamten pUL48 der benachbarten Zelle im Nukleus kommen und dadurch ein Signal visualisiert werden. In den verschiedenen Experimenten unter Zugabe von LMB konnte das Folgende beobachtet werden.

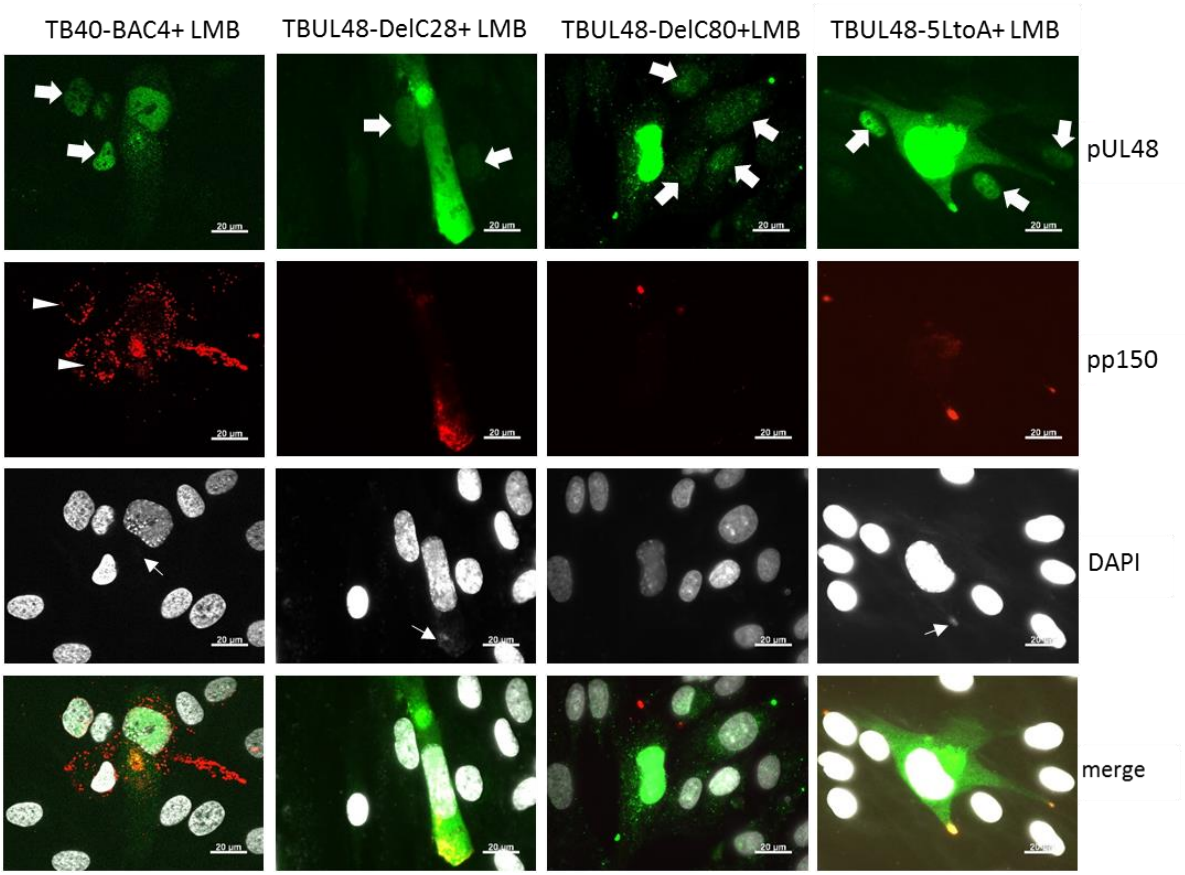



**Abbildung 29 Lokalisation von pUL48 und pp150 (pUL32) in benachbarten Zellen der primär infizierten humanen Fibroblasten (HFF), nach Behandlung mit Leptomycin B (LMB) % Tage nach Infektion**

Die Abbildungen zeigen repräsentative Aufnahmen infizierter HFF, nach Zugabe von LMB. Die verwendeten Viren umfassen den Wildtyp, TBUL48-DelC28, TBUL48-DelC80 und TBUL48-5LtoA. pUL48 wurde mit α-pUL48 (grün), hier in der ersten Zeile, detektiert. pp150 wurde mit anti-pp150 (rot), zweite Zeile, und der Zellkern mit DAPI (weiß), hier dritte Zeile, dargestellt. Die Intensität des pUL48- und DAPI-Signals wurden stark hochgezogen um die Sichtbarkeit der benachbarten Kerne zu verbessern. Die dünnen weißen Pfeile (⟶) zeigen die DAPI-Akkumulationen im vAC (viral Assembly Complex) oder den Zellausläufern. Die Pfeilspitzen (►) deuten auf perinukleäre pp150 Signale in benachbarten Zellen nach Infektion mit dem Wildtyp. Die breiten weißen Pfeile (➡) markieren zur primär infizierten Zelle benachbarte, pUL48-positive Zellkerne. Der Maßstabsbalken entspricht 20µm im Original.

Für den Wildtyp konnten auch nach Zugabe von LMB benachbarte pUL48-und pp150-positive Zellkerne gefunden werden (siehe Abbildung 29). Die pp150-Signale befanden sich bevorzugt um den Kern lokalisiert. Es kam stets zum gemeinsamen Auftreten von pUL48 und pp150 in den benachbarten Zellen. Nach Infektion mit der Deletionsmutante TBUL48-DelC28 und der Zugabe von LMB konnten wieder, zur primär infizierten Zellen direkt benachbarte pUL48-positive Zellkerne beobachtet

werden. Das Signal zeigte sich nach Zugabe von LMB deutlicher als im vorhergehenden Experiment. Die betroffenen Zellen zeigten im Unterschied zum Wildtyp kein Signal für pp150 (siehe Abbildung 29). Dieselben Beobachtungen pUL48-positiver benachbarter Zellkerne, konnten auch nach Infektion mit TBUl48-DelC80 gemacht werden.

Für den Virusstamm TBUL48-5LtoA konnte nach Zugabe von LMB eine Veränderung zum vorhergehenden Experiment gezeigt werden. Während ohne Zugabe des LMB keine pUL48-positiven Signale in benachbarten Zellen gefunden wurden, konnten diese nun in etwa einem Drittel aller primär infizierten Zellen entdeckt werden. In den besagten Zellen wurde jedoch kein pp150-positives Signal detektiert. Zur eindeutigen Klärung, ob diese benachbarten pUL48-positiven Zellen durch DNA-haltige, infektiöse Viruspartikel infiziert wurden, sollte ein anschließendes Experiment mit zusätzlicher Färbung auf IE-Proteine (Proteine der frühen Phase des HCMV-Replikationszyklus) durchgeführt werden. Aus Materialgründen konnte die Deletionsmutante TBUL48-DelC28 nicht miteinbezogen werden. Sämtliche Versuchsbedingungen entsprachen ansonsten den oben bereits beschriebenen.

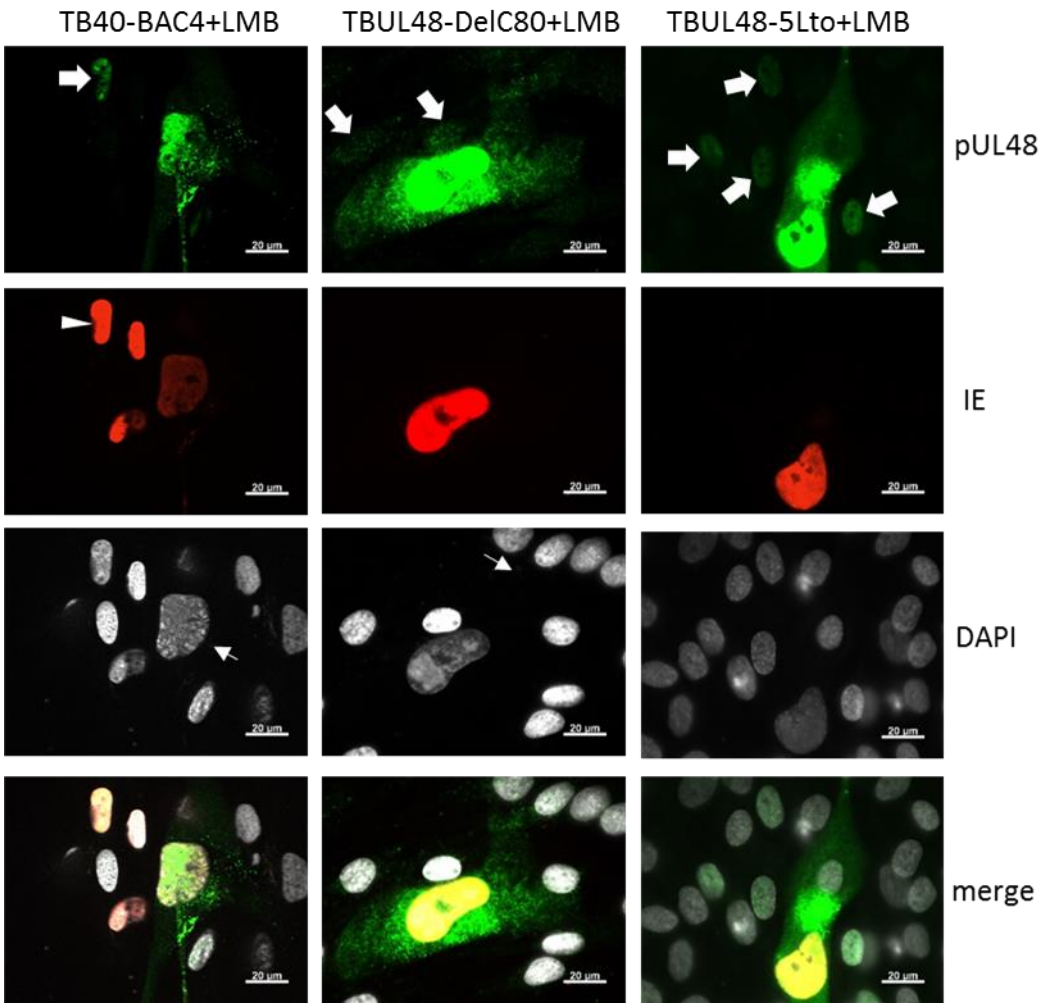



**Abbildung 30 Lokalisation von pUL48 und Immediate-early (IE) in benachbarten Zellen der primär infizierten Humanen Fibroblasten (HFF), nach Behandlung mit Leptomycin B (LMB) 5 Tage nach Infektion**

Die Abbildungen zeigen repräsentative Aufnahmen infizierter HFF, nach Zugabe von LMB. Verwendet wurden der Wildtyp TB40-BAC4, TBUL48-DelC80 und TBUL48-5LtoA. pUL48 wurde mit α-pUL48 (grün), hier in der ersten Zeile, detektiert. Immediate early (IE) wurde mit anti-IE (rot), zweite Zeile, und der Zellkern mit DAPI (weiß), hier dritte Zeile, dargestellt. Die Intensität des pUL48-Signals wurde stark hochgezogen um die Sichtbarkeit benachbarter Kerne zu verbessern. Die breiten weißen Pfeile (➡) markieren zur primär infizierten Zelle benachbarte, pUL48 positive Zellkerne. Die dünnen weißen Pfeile (→) zeigen auf sehr schwache DAPI-Akkumulationen. Die Pfeilspitzen (►) deuten im WT auf die benachbarte pUL-48 und IE-positive, sekundär infizierte Zelle. Der Maßstabsbalken entspricht 20µm im Original.

In diesem Experiment zeigten sich nach Wildtyp-Infektion und LMB-Behandlung folgende Beobachtungen (siehe Abbildung 30): Benachbarte, wahrscheinlich sekundär infizierte Zellkerne stellten sich entweder ausschließlich IE-positiv dar oder waren zusätzlich pUL48 positiv. Es konnten keine ausschließlich pUL48-

positiven Nuklei gefunden werden. Nach Infektion mit dem Virusstamm TBUL48-DelC80 und der Behandlung mit LMB konnten hier benachbarte pUL48-positive Zellkerne gefunden werden, diese waren nicht IE-positiv. Auch für die Infektion mit TBUL48-5LtoA konnten diese Beobachtungen der ausschließlich pUL48-positiven benachbarten Zellkerne gemacht werden.

# 4 Diskussion

HCMV kommt heute eine große Bedeutung in der Schwangerschafts-/ Transplantations- und Infektionsmedizin zu. Die aktuell zur Verfügung stehenden Behandlungsmöglichkeiten sind risiko- und nebenwirkungsreich. Trotzdem ist der genaue Prozess der Virusmorphogenese in seinen Teilschritten noch weitgehend unklar und wenig verstanden. Deswegen ist es wichtig die Funktionen der einzelnen viralen Proteine besser zu untersuchen. Der gegenwärtige Forschungsstand zeigt, dass die Tegumentproteine relevante Funktionen in diesem Prozess einnehmen. Diese betreffen vor allem die Tegumentierung und Umhüllung der Viruspartikel [67]. Das wird auch für das essentielle Protein pUL48 angenommen [42]. Welche Funktion pUL48 so unabdingbar für den viralen Replikationszyklus macht, ist bisher allerdings ungeklärt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der C-Terminus des Proteins analysiert. Dabei konnten wir zeigen, dass er essentielle Voraussetzung für einen vollständigen HCMV-Replikationszyklus ist. Außerdem gelang es uns im C-Terminus zwei wichtige Funktionen zu identifizieren. Zum einen konnten wir durch Lokalisationsstudien dort teilweise die Funktion des nukleären Exports von pUL48 identifizieren. Zum anderen fanden wir bei Mutationen im C-Terminus des Proteins eine veränderte Kapsidlokalisation.

## 4.1 Identifizierung des nukleären Exportsignals

Die Lokalisation von pUL48 im Zytoplasma während der Infektion und dessen Kernlokalisation in transfizierten Zellen [18] gibt bereits erste Hinweise auf die Existenz nukleärer Exportaktivität dieses Proteins. Außerdem konnte für pUL48 bereits shuttling-Aktivität zwischen Zellkern und Zytoplasma gezeigt werden [18, 42]. Die Immunfluoreszenzuntersuchungen dieser Arbeit konnten für Wildtypvirusinfektionen sowohl die zytoplasmatische Lokalisation als auch die Hemmbarkeit des nukleären Exports durch LMB und somit abstrahierend das „nucleocytoplasmic-shuttling“ zeigen. In vorhergehenden Studien mit der Virusmutante TBUL48-DelC80 konnte eine veränderte Lokalisation von pUL48 vorwiegend im Zellkern und weniger im Zytoplasma beobachtet werden (unveröffentlichte Daten Jens von Einem, Universitätsklink Ulm). Daraus ergab sich die Vermutung einer NES in den C-terminalen 80 AS. Eine Leucin-reiche Sequenz in diesem Bereich wurde durch Tools (NetNES 1.1 Server) als potentielle NES

vorhergesagt. Auch diese Daten konnten durch die Immunfluoreszenzexperimente mit und ohne LMB im Rahmen dieser Arbeit für die Infektion bestätigt werden (siehe Abbildung 18). Diese Mutante eignete sich somit als gute Kontrolle für die Experimente mit den neuen Mutanten.

Einige Tegumentproteine, so auch das pUL48, sind innerhalb der Familie der Herpesviridae konserviert [16]. Auch scheinen einige Eigenschaften und funktionelle Domänen wie z. B. ein Kernlokalisationssignal in den Homologen von pUL48 konserviert zu sein [1]. Hinsichtlich einer NES der Homologe gibt es jedoch bisher keinerlei Angaben. Für pUL36 (pUL48 Homolog in HSV-1 und PrV) wurden zwar Motive für funktionelle NLS gefunden [86], welche den Kernimport erklären können, für keines der beiden Viren wurde aber der Export aus dem Kern näher untersucht. Die Einzelschritte und die Regulation des „nucleocytoplasmic-shuttling“, insbesondere den Export betreffend, sind im viralen Replikationszyklus der Herpesviren bisher nur unvollständig untersucht und verstanden. Die zu Beginn der Arbeit vermutete NES im Bereich der Aminosäuren 2213-2223 des C-Terminus ähnelte von der Sequenz stark einer sogenannten PKI-like NES [60]. Dieser Vertreter gilt als Prototyp der NES und als häufigstes Muster hydrophober As [60]. Bei Veränderungen dieser präzisen Aminosäuresequenz, beispielsweise durch Punktmutation der hydrophoben As, wird die gesamte NES funktionsunfähig. Aus diesem Grund wurden in der Virusmutante TBUL48-5LtoA alle fünf hydrophoben Leucine durch hydrophile Alanine ausgetauscht. Die Immunfluoreszensanalyse der vermuteten NES-Mutante TBUL48-5LtoA zeigte aber wider Erwarten keine nukleäre Lokalisation von pUL48 sondern das exakte Lokalisationsmuster des Wildtyps (Abbildung 17). LMB-Experimente bestätigten gleichzeitig auch die fortbestehende Hemmbarkeit des nukleären Exports des mutierten pUL48. Beide Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Export von pUL48 aus dem Kern durch den Austausch der Leucine nicht wesentlich beeinträchtigt wird. Somit muss angenommen werden, dass der Bereich der Aminosäuren 2213-2223 trotz Vorhersage und Ähnlichkeit mit bereits postulierten NES-Konsensussequenzen nicht für eine funktionelle NES kodiert. Alternativ muss in Betracht gezogen werden, dass der Ausfall dieser NES durch die Existenz weiterer funktionierender NES im Protein kompensiert werden kann. Eine Kompensation der fehlenden NES durch eine weitere wurde bereits für andere virale Proteine der Herpesvirusfamilie, z.B. für das Protein Mta des EBV,

gezeigt [25]. Alle bekannten NES anderer Tegumentproteine der Herpesviren, wie beispielsweise pUL94 (HCMV) und ORF 10-Protein (VZV), wurden bisher als singulär auftretend beschrieben [21, 76]. Durch die Mutation selbst könnte es nicht nur zu einer veränderten Primärstruktur des Proteins, sondern auch zu Änderungen der räumlichen Struktur kommen. Dadurch könnte eine nicht vorhergesagte Aminosäuresequenz durch Umlagerung aktiv werden. Diese Option ist allerdings nicht zu erwarten, da sowohl Leucin als auch Alanin neutrale AS sind und beide zu den sogenannten Helixbildnern zählen [118, 121]. Eine weitere Möglichkeit stellt der nukleäre Export von pUL48 über eine Interaktion mit weiteren viralen oder zellulären Proteinen dar. Dadurch könnte pUL48, trotz seiner Größe, ohne eigene funktional aktive NES aus dem Kern exportiert werden. Die Vorexperimente mit dem punktmutierten pUL48 in der Transfektion lieferten Indizien, dass es sich hierbei wohl um ein virales Protein und nicht um ein zelluläres handelt muss, da eine partielle Akkumulation von pUL48 im Kern festgestellt wurde (persönliche Kommunikation Ivonne Brock). Gleichzeitig fanden wir in den Immunfluoreszenzversuchen während der Infektion keine Signale für pUL48 im Kern. Folglich kommt nur die Interaktion mit einem anderen viralen Protein in Frage. Mögliche Kandidaten können hier bereits bekannte Interaktionspartner des Proteins sein. In Frage kämen dafür pUL47 und pUL69. Hierzu ist ausschließlich bekannt, dass der gesicherte Interaktionspartner pUL47, zumindest für HCMV, nicht eigenständig aus dem Kern exportiert wird [23]. Auch pUL69 muss auf Grund seiner demonstrierten „nucleocytoplasmic-shuttling“ Aktivität in Betracht gezogen werden [75]. Allerdings kann der nukleäre Export von pUL69 nicht durch LMB gehemmt werden [75]. Da in unseren LMB-Immunfluoreszenzexperimenten aber eine Hemmbarkeit des nukleären Exports von pUL48 festgestellt wurde, spricht dieser Befund gegen pUL69.

Die Analysen der wenigen bekannten NES weiterer Tegumentproteine der Herpesviren ergaben für VP13/14 (HSV-1) eine Rev-like NES innerhalb der C-terminalen 40 Aminosäuren, eine C-terminale NES für pUL94 (HCMV) [76], eine C-terminale NES in ORF 10 (VZV) [21] und den Tegumentproteinen VP8 [151] und 22 [152] des Bovinen Herpesvirus 1. Auf der Basis der Überlegungen, dass sich in der pUL48-Sequenz eine Leucin-reiche Sequenz mit hoher prädiktiver Vorhersage (NetNES 1.1 Server) befindet, die Deletion der finalen 80 Aminosäuren im C-

Terminus einen Phänotyp mit starker nukleärer Lokalisation ergibt und die publizierten Daten zu NES weiterer Tegumentproteine auf eine Lokalisation im C-Terminus schließen lassen, entschlossen wir uns zur Generierung einer neuen Virusmutante: TBUL48-DelC28 (siehe Ergebnisse). Die Deletion der C-terminalen 28 Aminosäuren beinhaltete die kritische NES und die C-terminal folgenden Aminosäuren. Die erneute Durchführung der Immunfluoreszenzexperimente ergab nun eine nukleäre und zytoplasmatische Lokalisation von pUL48 (siehe Abbildung 25). Folglich scheint die Deletion der C-terminalen 28 Aminosäuren den nukleären Export zu beeinträchtigen. Durch Zugabe von LMB konnte aber weiterhin eine geringe Intensitätssteigerung des nukleären pUL48- Signals erreicht werden. Der direkte Vergleich mit der Virusmutante TBUL48-DelC80 ergab außerdem für TBUL48-DelC28 ein schwächeres nukleäres Signal. Daraus lässt sich folgern, dass die Deletion der 28 Aminosäuren eine Einschränkung des nukleären Exports bewirkt, diese aber im Phänotyp bei Deletion der gesamten 80 Aminosäuren stärker auftritt. Möglich wäre, dass die finalen 28 Aminosäuren nicht die gesamte nukleäre Exportsequenz des Proteins, sondern nur einen Teil umfassen. Unter Einbezug der Aminosäure 2212, bei welcher es sich um ein Isoleucin handelt, könnte eine andere NES-Konsensussequenz gebildet werden, welche einer Rev-like-NES entspricht: 2212 **I L** R **L** V R **L** D **L** 2220 → $\phi_0\phi_1 x\phi_2 xx\phi_3 x\phi_4$ [60]. Allerdings bleibt sehr fraglich, ob eine verbleibende Aminosäure dieser Sequenz einen Einfluss auf das Ausmaß der Transportaktivität haben kann, da alle hydrophoben Positionen außer $\phi_0$ durch die Deletion erfasst wurden.Weitere Sequenz- und Mutationsanalyse könnten diese Frage klären.

## 4.2 Die Bedeutung des C-Terminus für die Virusmorphogenese

Der C-Terminus des pUL48 in HCMV ist ein bislang wenig charakterisierter Bereich. Während im N-Terminus des Proteins mehrere funktionelle Domänen wie die NLS [18] und die Deubiquitinase-Aktivität [68] lokalisiert sind, ist über im C-Terminus kodierte Funktionen sehr wenig bekannt. Unveröffentlichte, laborinterne Daten (Jens von Einem, Universitätsklinik Ulm) mit der TBUL48-DelC80 Mutante lieferten dabei wichtige Hinweise auf die Funktionen des pUL48 C-Terminus. Dabei führte die Deletion der finalen 80 Aminosäuren erstens zu einer veränderten Lokalisation

des Proteins mit deutlichen Akkumulationen im Zellkern in Immunfluoreszenzstudien (siehe Abbildung 17). Dieses Ergebnis führte zu der Vermutung, dass eine NES in diesem Bereich lokalisiert sein könnte. Zweitens wurde eine veränderte Lokalisation von pp150 festgestellt. pp150 lokalisierte in den Immunfluoreszenzexperimenten dieser Mutante nicht im vAC (wie für den Wildtyp bekannt), sondern in der Zellperipherie (Abbildung 19). Dieses Tegumentprotein gilt als sehr eng assoziiert mit dem Kapsid und wird deshalb auch als Marker für die Detektion von zytoplasmatischen Kapsiden verwendet [149]. Auf Grund dessen und der gleichzeitigen DAPI- Kolokalisation in den Zellausläufern gingen wir von einer veränderten Kapsidlokalisation nach Infektion mit TBUL48-DelC80 aus. Gleichzeitig wurde dabei auch eine Entkopplung der pp150 und pUL48-Lokalisation beobachtet. Daraus kann auf eine zweite Funktion des C-Terminus geschlossen werden, die Assoziation von pUL48 mit dem Kapsid. Die Anlagerung der Tegumentproteine an das Kapsid ist ein essentieller Schritt der Virusmorphogenese. Allerdings ist der genaue Prozess weitgehend unverstanden. Es ist weder bekannt, welches Tegumentprotein der Initiator der Tegumentierung von viralen Kapsiden ist, noch in welchem Kompartiment (Nukleus oder Zytoplasma) der Vorgang für HCMV stattfindet [113]. Für die Alpha-Herpesviren ist bereits gezeigt worden, dass das pUL48-Homolog pUL36 eine C-terminal lokalisierte Domäne für die Assoziation mit dem Kapsid besitzt und diese innerhalb der Alpha-Herpesviren konserviert ist [30, 116]. Für HSV-1 konnte weiterhin gezeigt werden, dass pUL36 für die Bindung weiterer Tegumentproteine an das Kapsid essentiell ist [44]. Außerdem ist für PrV bekannt, dass die C-terminalen 62 Aminosäuren des UL36 essentiell für die Virusreplikation sind [14, 30]. Auf Grund des hoch konservierten Musters für pUL48 innerhalb der Herpesviren lassen diese Daten auf eine essentielle Funktion des C-Terminus durch eine funktionelle Kapsid-Interaktionsdomäne im pUL48 von HCMV schließen. Für die essentielle Bedeutung des C-Terminus sprechen auch die Ergebnisse dieser Arbeit: Die verschiedenen Wachstumskinetiken und die durchgeführten Focus expansion Assays zeigen für alle drei Mutanten, mit Deletion oder Veränderungen im C-Terminus, Defekte bei der direkten Virusausbreitung und Freisetzung infektiöser Viruspartikel. Auch die schwierige Rekonstitution dieser Mutanten, die nur unter komplementierenden Bedingungen erfolgreich war, spricht für eine Störung der Virusmorphogenese, die durch Veränderungen im C-Terminus von pUL48 verursacht wird. Passend zu den Ergebnissen der Wachstumsanalysen

konnte auch in den Immunfluoreszenzexperimenten keine Infektion benachbarter Zellen festgestellt werden. Die Elektronenmikroskopie bestätigte diese These, da in zwei Mutanten mit Veränderungen des pUL48-C-Terminus keine extrazellulären Viruspartikel gefunden wurden (Die TBUL48-DelC28-Mutante konnte aus zeitlichen Gründen nicht ultrastrukturell analysiert werden). Da die Deletion von 28 Aminosäuren im C-Terminus von pUL48 und sogar die Punktmutation von nur fünf Aminosäuren hier zu derselben Wachstumseinschränkung führten wie die Deletion der gesamten 80 finalen Aminosäuren, scheinen selbst einzelne Aminosäuren des C-Terminus wichtig für die Bildung infektiöser Viren zu sein. Diese Erkenntnis könnte für zukünftige antivirale Strategien von Bedeutung sein, da nicht das gesamte Protein ausgeschaltet werden muss, um die Virusreplikation irreversibel zu stören, sondern einzelne Aminosäuren als Targets ausreichen könnten. In den Immunfluoreszenzexperimenten ergab sich für die Mutanten TBUL48-DelC80, UL48-DelC28 und TBUL48-5LtoA eine veränderte Lokalisation der Kapside in der Zelle. Hinzu kommt außerdem eine Entkopplung der Lokalisation von pUL48 und dem Kapsid. Unterstützend zeigte auch die EM, im Vergleich zum Wildtyp, veränderte Kapsidlokalisation in den Zellausläufern anstatt im vAC. Daraus kann geschlossen werden, dass die Interaktion zwischen pUL48 und dem Kapsid durch die Deletionen im C-Terminus sowie die fünf Punktmutationen in diesem Bereich beeinträchtigt wird. Durch welche Sequenz diese Interaktion genau kodiert wird, bleibt dabei allerdings unklar. Bislang wurde vermutet, dass es sich hier um die Interaktionsdomäne mit dem Protein pUL77 handeln könnte (Diplomarbeit Ivonne Brock, Universität Ulm). Für diese Interaktion werden die C-terminalen 11 Aminosäuren verantwortlich gemacht. Experimente zu diesem Thema wurden im Labor zeitgleich zu dieser Arbeit mit einer Deletionsmutante der C-terminalen 10 Aminosäuren durchgeführt (unveröffentlichte Daten Matthias Kaupp, Universitätsklinikum Ulm). Diese Arbeiten ergaben eine veränderte Lokalisation der Kapside intrazellulär und auch eine Entkopplung von pUL48. Auf Basis dieser Arbeit kann gesagt werden, dass die vermutete Kapsidinteraktion nicht auf die zehn Aminosäuren beschränkt bleibt. Denn keine der mutierten Aminosäuren der TBUL48-5LtoA-Mutante war in diesem Bereich lokalisiert, trotzdem kam es zu einer veränderten Kapsidlokalisation und einer Entkopplung von der pUL48 und dem Kapsid. Weitere Mutationsanalysen könnten hier zukünftig ansetzen und Klarheit über die spezifische Kapsidinteraktionsdomäne von pUL48 bringen.

## 4.3 Selektive Ausbreitung von pUL48 über *Dense bodies*

Die Immunfluoreszenzexperimente zeigten für alle Mutanten im Bereich des C-Terminus von pUL48 zur primär-infizierten Zelle benachbarte, pUL48-positive Zellkerne. In diesen benachbarten Zellen konnten wir keine viralen Kapside (pp150) und keine Infektion (IE-Proteine) beobachten. pUL48 schien sich unabhängig von der viralen DNA und den viralen Kapsiden auszubreiten (siehe Abbildungen 28 und 29). Neben den Virionen sind noch zwei weitere Partikel bekannt, welche von HCMV-infizierten Zellen produziert werden, NIEPS und *„Dense bodies*“ (DB) [56, 141]. NIEPS enthalten keine virale DNA, aber fast alle Proteine der infektiösen Virionen [85]. Folglich müssten benachbarte Zellen IE-negativ, aber sowohl pp150 als auch pUL48-positiv sein. Insofern scheint dieser Verbreitungsweg unwahrscheinlich. DB hingegen beinhalten weder virale DNA noch Kapside [33, 45, 114, 132]. Sie bestehen vor allem aus Glykoproteinen und Tegumentproteinen, wobei pp65 der wichtigste Bestandteil zu sein scheint [117]. Auch pUL48 ist bekanntermaßen Bestandteil von DB [5], während pp150 nur in geringen Mengen darin vorkommt. Folglich bietet die selektive Verbreitung von pUL48 durch DB in die direkt benachbarten HFF einer primär infizierten Zelle eine plausible Erklärung. Aus der Entkopplung des pUL48 vom Kapsid scheint eine vermehrte Produktion von DB zu resultieren. Weitere Experimente mit Färbungen anderer Proteine z.B. pp65 könnten zur Bestätigung diese Hypothese beitragen.

# 5 Zusammenfassung

Die Morphogenese von infektiösen Viruspartikeln des humanen Zytomegalievirus (HCMV) findet in zwei unterschiedlichen Zellkompartimenten statt, dem Zellkern und dem Zytoplasma. Die Tegumentierung ist essentieller Bestandteil bei der Morphogenese, bei welcher zahlreiche virale Proteine in das sich bildende Virion eingebaut werden und die Verbindung zwischen dem Kapsid und der Hüllmembran herstellen. Die Initiierung der Tegumentierung, die daran beteiligten Proteine und deren intrazelluläre Lokalisation sind allerdings noch weitgehend unklar. Das Tegumentprotein pUL48 ist eines der größten viralen Proteine, welches innerhalb der Herpesviren hochkonserviert ist und bei der Tegumentierung eine entscheidende Rolle spielt. Dabei scheint es so zu sein, dass der C-Terminus dieses Proteins für dessen Funktion im viralen Replikationszyklus essentiell ist. In dieser Arbeit konnten die Bedeutung des C-Terminus von pUL48 bestätigt und darüber hinaus zwei funktionelle Domänen identifizieren werden. Zum einen ist im C-Terminus eine nukleäre Exportfunktion determiniert und zum anderen befinden sich dort auch wichtige Bereiche für die Assoziation von pUL48 mit dem Kapsid. Für diese Untersuchungen wurden vier Viren mit verschiedenen Mutationen des pUL48-C-Terminus charakterisiert. Durch Wachstumskinetiken und den Fokus-Expansion-Assay konnten gezeigt werden, dass der C-Terminus des pUL48 für die Virusausbreitung und Morphogenese infektiöser Partikel essentiell ist. Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz und der Elektronenmikroskopie konnte für Mutationen im C-Terminus von pUL48 eine beeinträchtigte Interaktion zwischen pUL48 und dem Kapsid festgestellt werden, was vermutlich zu einer Akkumulation von nur teilweise tegumentierten Kapsiden in der Zellperipherie führt. Lokalisationsstudien mit pUL48 konnten außerdem eine verstärkte nukleäre Akkumulation des Proteins, bei Deletion der C-terminalen 80 und 28 Aminosäuren, feststellen. Allerdings konnte eine zu diesen Beobachtungen passende nukleäre Exportsequenz in pUL48, welche durch Analysetools vorhergesagt war, mittels Immunfluoreszenzmikroskopie nur partiell bestätigt werden. Somit führte diese Arbeit durch die Entdeckung neuer essentieller Domänen nicht nur zu einem Erkenntnisgewinn bezüglich der Tegumentierung und der Bedeutung des Tegumentproteins pUL48 für den viralen Replikationszyklus, sondern identifizierte außerdem eventuelle zukünftige Targets für eine antivirale HCMV-Therapie.

# 6. Literaturverzeichnis Literaturverzeichnis


1. Abaitua, F., O'Hare, P.: Identification of a highly conserved, functional nuclear localization signal within the N-terminal region of herpes simplex virus type 1 VP1-2 tegument protein. J Virol 82: 5234-5244 (2008)
2. Adachi, Y., Yanagida, M.: Higher order chromosome structure is affected by cold-sensitive mutations in a Schizosaccharomyces pombe gene crm1+ which encodes a 115-kD protein preferentially localized in the nucleus and its periphery. J Cell Biol 108: 1195-1207 (1989)
3. Askjaer, P., Jensen, T.H., Nilsson, J., Englmeier, L., Kjems, J.: The specificity of the CRM1-Rev nuclear export signal interaction is mediated by RanGTP. J Biol Chem 273: 33414-33422 (1998)
4. AuCoin, D.P., Smith, G.B., Meiering, C.D., Mocarski, E.S.: Betaherpesvirus-conserved cytomegalovirus tegument protein ppUL32 (pp150) controls cytoplasmic events during virion maturation. J Virol 80: 8199-8210 (2006)
5. Baldick, C.J., Jr., Shenk, T.: Proteins associated with purified human cytomegalovirus particles. J Virol 70: 6097-6105 (1996)
6. Balfour, H.H., Jr.: Management of cytomegalovirus disease with antiviral drugs. Rev Infect Dis 12: 849-860 (1990)
7. Baxter, M.K., Gibson, W.: Cytomegalovirus basic phosphoprotein (pUL32) binds to capsids in vitro through its amino one-third. J Virol 75: 6865-6873 (2001)
8. Bechtel, J.T., Shenk, T.: Human cytomegalovirus UL47 tegument protein functions after entry and before immediate-early gene expression. J Virol 76: 1043-1050 (2002)
9. Bednenko, J., Cingolani, G., Gerace, L.: Nucleocytoplasmic Transport: Navigating the Channel. Traffic 4: 127-135 (2003)

10. Bhella, D., Rixon, F.J., Dargan, D.J.: Cryomicroscopy of human cytomegalovirus virions reveals more densely packed genomic DNA than in herpes simplex virus type 1. J Mol Biol 295: 155-161 (2000)

11. Biron, K.K.: Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases. Antiviral Res 71: 154-163 (2006)

12. Bodaghi, B., Slobbe-van Drunen, M.E., Topilko, A., Perret, E., Vossen, R.C., van Dam-Mieras, M.C., Zipeto, D., Virelizier, J.L., LeHoang, P., Bruggeman, C.A., Michelson, S.: Entry of human cytomegalovirus into retinal pigment epithelial and endothelial cells by endocytosis. Invest Ophthalmol Vis Sci 40: 2598-2607 (1999)

13. Borst, E.M., Hahn, G., Koszinowski, U.H., Messerle, M.: Cloning of the human cytomegalovirus (HCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome in Escherichia coli: a new approach for construction of HCMV mutants. J Virol 73: 8320-8329 (1999)

14. Böttcher, S., Klupp, B.G., Granzow, H., Fuchs, W., Michael, K., Mettenleiter, T.C.: Identification of a 709-Amino-Acid Internal Nonessential Region within the Essential Conserved Tegument Protein (p)UL36 of Pseudorabies Virus. J Virol 80: 9910-9915 (2006)

15. Boyle, K.A., Compton, T.: Receptor-binding properties of a soluble form of human cytomegalovirus glycoprotein B. J Virol 72: 1826-1833 (1998)

16. Bradshaw, P.A., Duran-Guarino, M.R., Perkins, S., Rowe, J.I., Fernandez, J., Fry, K.E., Reyes, G.R., Young, L., Foung, S.K.: Localization of antigenic sites on human cytomegalovirus virion structural proteins encoded by UL48 and UL56. Virology 205: 321-328 (1994)

17. Britt, W.J., Boppana, S.: Human cytomegalovirus virion proteins. Hum Immunol 65: 395-402 (2004)

18. Brock, I., Kruger, M., Mertens, T., von Einem, J.: Nuclear targeting of human cytomegalovirus large tegument protein pUL48 is essential for viral growth. J Virol 87: 6005-6019 (2013)

19. Bruminhent, J., Razonable, R.R.: Management of cytomegalovirus infection and disease in liver transplant recipients. World Journal of Hepatology 6: 370-383 (2014)

20. Buser, C., Walther, P., Mertens, T., Michel, D.: Cytomegalovirus primary envelopment occurs at large infoldings of the inner nuclear membrane. J Virol 81: 3042-3048 (2007)

21. Cai, M., Wang, S., Long, J., Zheng, C.: Probing of the nuclear import and export signals and subcellular transport mechanism of varicella-zoster virus tegument protein open reading frame 10. Medical Microbiology and Immunology 201: 103-111 (2012)

22. Cannon, M.J., Schmid, D.S., Hyde, T.B.: Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. Rev Med Virol 20: 202-213 (2010)

23. Cappadona, I., Villinger, C., Schutzius, G., Mertens, T., von Einem, J.: Human Cytomegalovirus pUL47 Modulates Tegumentation and Capsid Accumulation at the Viral Assembly Complex. J Virol 89: 7314-7328 (2015)

24. Chen, J., Zhang, H., Chen, P., Lin, Q., Zhu, X., Zhang, L., Xue, X.: Correlation between systemic lupus erythematosus and cytomegalovirus infection detected by different methods. Clin Rheumatol 34: 691-698 (2015)

25. Chen, L., Liao, G., Fujimuro, M., Semmes, O.J., Hayward, S.D.: Properties of two EBV Mta nuclear export signal sequences. Virology 288: 119-128 (2001)

26. Cheng, J., Ke, Q., Jin, Z., Wang, H., Kocher, O., Morgan, J.P., Zhang, J., Crumpacker, C.S.: Cytomegalovirus infection causes an increase of arterial blood pressure. PLoS Pathog 5: e1000427 (2009)

27. Cheung, T.W., Teich, S.A.: Cytomegalovirus infection in patients with HIV infection. Mt Sinai J Med 66: 113-124 (1999)

28. Chook, Y., Blobel, G.: Karyopherins and nuclear import. Curr Opin Struct Biol 11: 703-715 (2001)

29. Chrisp, P., Clissold, S.P.: Foscarnet. A review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use in immunocompromised patients with cytomegalovirus retinitis. Drugs 41: 104-129 (1991)

30. Coller, K.E., Lee, J.I.H., Ueda, A., Smith, G.A.: The capsid and tegument of the alphaherpesviruses are linked by an interaction between the UL25 and VP1/2 proteins. J Virol 81: 11790-11797 (2007)

31. Cook, A.G., Conti, E.: Nuclear export complexes in the frame. Curr Opin Struct Biol 20: 247-252 (2010)

32. Corbett, A.H., Silver, P.A.: Nucleocytoplasmic transport of macromolecules. Microbiology and Molecular Biology Reviews 61: 193-211 (1997)

33. Craighead, J.E., Kanich, R.E., Almeida, J.D.: Nonviral Microbodies with Viral Antigenicity Produced in Cytomegalovirus-Infected Cells. J Virol 10: 766-775 (1972)

34. Cristea, I.M., Moorman, N.J., Terhune, S.S., Cuevas, C.D., O'Keefe, E.S., Rout, M.P., Chait, B.T., Shenk, T.: Human cytomegalovirus pUL83 stimulates activity of the viral immediate-early promoter through its interaction with the cellular IFI16 protein. J Virol 84: 7803-7814 (2010)

35. Cristea, I.M., Moorman, N.J., Terhune, S.S., Cuevas, C.D., O'Keefe, E.S., Rout, M.P., Chait, B.T., Shenk, T.: Human Cytomegalovirus pUL83 Stimulates Activity of the Viral Immediate-Early Promoter through Its Interaction with the Cellular IFI16 Protein. J Virol 84: 7803-7814 (2010)

36. Crumpacker, C.S.: Ganciclovir. N Engl J Med 335: 721-729 (1996)

37. Cunha Ade, A., Marin, L.J., Aquino, V.H., Figueiredo, L.T.: Diagnosis of cytomegalovirus infections by qualitative and quantitative PCR in HIV infected patients. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 44: 127-132 (2002)

38. Dahle, A.J., Fowler, K.B., Wright, J.D., Boppana, S.B., Britt, W.J., Pass, R.F.: Longitudinal investigation of hearing disorders in children with congenital cytomegalovirus. J Am Acad Audiol 11: 283-290 (2000)

39. Das, S., Vasanji, A., Pellett, P.E.: Three-dimensional structure of the human cytomegalovirus cytoplasmic virion assembly complex includes a reoriented secretory apparatus. J Virol 81: 11861-11869 (2007)

40. Desai, P.J.: A null mutation in the UL36 gene of herpes simplex virus type 1 results in accumulation of unenveloped DNA-filled capsids in the cytoplasm of infected cells. J Virol 74: 11608-11618 (2000)

41. Dingwall, C., Laskey, R.A.: Nuclear import: A tale of two sites. Current Biology 8: 922-924

42. Dunn, W., Chou, C., Li, H., Hai, R., Patterson, D., Stolc, V., Zhu, H., Liu, F.: Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 14223-14228 (2003)

43. Eggers, M., Bogner, E., Agricola, B., Kern, H.F., Radsak, K.: Inhibition of human cytomegalovirus maturation by brefeldin A. J Gen Virol 73 2679-2692 (1992)

44. Fan, W.H., Roberts, A.P.E., McElwee, M., Bhella, D., Rixon, F.J., Lauder, R.: The Large Tegument Protein pUL36 Is Essential for Formation of the Capsid Vertex-Specific Component at the Capsid-Tegument Interface of Herpes Simplex Virus 1. J Virol 89: 1502-1511 (2015)

45. Fiala, M., Honess, R.W., Heiner, D.C., Heine, J.W., Murnane, J., Wallace, R., Guze, L.B.: Cytomegalovirus proteins. I. Polypeptides of virions and dense bodies. J Virol 19: 243-254 (1976)

46. Field, A.K., Davies, M.E., DeWitt, C., Perry, H.C., Liou, R., Germershausen, J., Karkas, J.D., Ashton, W.T., Johnston, D.B., Tolman, R.L.: 9-([2 -hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy]methyl)guanine: a selective inhibitor of herpes group virus replication. Proc Natl Acad Sci U S A 80: 4139-4143 (1983)

47. Fischer, U., Huber, J., Boelens, W.C., Mattajt, L.W., Lührmann, R.: The HIV-1 Rev Activation Domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. Cell 82: 475-483

48. Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M., Mattaj, I.W.: CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. Cell 90: 1051-1060 (1997 )

49. Fowler, K.B.: Congenital cytomegalovirus infection: audiologic outcome. Clin Infect Dis 57 Suppl 4: S182-184 (2013)

50. Fowler, K.B., Boppana, S.B.: Congenital cytomegalovirus (CMV) infection and hearing deficit. J Clin Virol 35: 226-231 (2006)

51. Fowler, K.B., McCollister, F.P., Dahle, A.J., Boppana, S., Britt, W.J., Pass, R.F.: Progressive and fluctuating sensorineural hearing loss in children with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection. The Journal of Pediatrics 130: 624-630

52. Fowler, K.B., Stagno, S., Pass, R.F., Britt, W.J., Boll, T.J., Alford, C.A.: The Outcome of Congenital Cytomegalovirus Infection in Relation to Maternal Antibody Status. New England Journal of Medicine 326: 663-667 (1992)

53. Gallant, J.E., Moore, R.D., Richman, D.D., Keruly, J., Chaisson, R.E.: Incidence and natural history of cytomegalovirus disease in patients with advanced human immunodeficiency virus disease treated with zidovudine. The Zidovudine Epidemiology Study Group. J Infect Dis 166: 1223-1227 (1992)

54. Gandhi, M.K., Khanna, R.: Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. Lancet Infect Dis 4: 725-738 (2004)

55. Gibson, W.: Structure and assembly of the virion. Intervirology 39: 389-400 (1996)

56. Gibson, W., Irmiere, A.: Selection of particles and proteins for use as human cytomegalovirus subunit vaccines. Birth Defects Orig Artic Ser 20: 305-324 (1984)

57. Goegebuer, T., Van Meensel, B., Beuselinck, K., Cossey, V., Van Ranst, M., Hanssens, M., Lagrou, K.: Clinical Predictive Value of Real-Time PCR Quantification of Human Cytomegalovirus DNA in Amniotic Fluid Samples. Journal of Clinical Microbiology 47: 660-665 (2009)

58. Goldmacher, V.S.: Cell death suppression by cytomegaloviruses. Apoptosis 10: 251-265 (2005)

59. Gorlich, D., Kutay, U.: Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. Annu Rev Cell Dev Biol 15: 607-660 (1999)

60. Guttler, T., Madl, T., Neumann, P., Deichsel, D., Corsini, L., Monecke, T., Ficner, R., Sattler, M., Gorlich, D.: NES consensus redefined by structures of PKI-type and Rev-type nuclear export signals bound to CRM1. Nat Struct Mol Biol 17: 1367-1376 (2010)

61. Hamprecht, K., Jahn, G.: Human cytomegalovirus and congenital virus infection. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz 50: 1379-1392 (2007)

62. Hamprecht, K., Maschmann, J., Jahn, G., Poets, C.F., Goelz, R.: Cytomegalovirus transmission to preterm infants during lactation. Journal of Clinical Virology 41: 198-205

63. Hannemann, H., Rosenke, K., O'Dowd, J.M., Fortunato, E.A.: The presence of p53 influences the expression of multiple human cytomegalovirus genes at early times postinfection. J Virol 83: 4316-4325 (2009)

64. Hicks, G.R., Raikhel, N.V.: Protein Import into the Nucleus: An Integrated View. Annual Review of Cell and Developmental Biology 11: 155-188 (1995)

65. Isaacson, M.K., Feire, A.L., Compton, T.: Epidermal growth factor receptor is not required for human cytomegalovirus entry or signaling. J Virol 81: 6241-6247 (2007)

66. Kalejta, R.F.: Functions of human cytomegalovirus tegument proteins prior to immediate early gene expression. Curr Top Microbiol Immunol 325: 101-115 (2008)

67. Kalejta, R.F.: Tegument proteins of human cytomegalovirus. Microbiol Mol Biol Rev 72: 249-265, table of contents ( 2008)

68. Kim, E.T., Oh, S.E., Lee, Y.-O., Gibson, W., Ahn, J.-H.: Cleavage Specificity of the UL48 Deubiquitinating Protease Activity of Human Cytomegalovirus and the Growth of an Active-Site Mutant Virus in Cultured Cells. J Virol 83: 12046-12056 (2009)

69. Kudo, N., Wolff, B., Sekimoto, T., Schreiner, E.P., Yoneda, Y., Yanagida, M., Horinouchi, S., Yoshida, M.: Leptomycin B Inhibition of Signal-Mediated Nuclear Export by Direct Binding to CRM1. Experimental Cell Research 242: 540-547 (1998)

70. Kurath, S., Halwachs-Baumann, G., Müller, W., Resch, B.: Transmission of cytomegalovirus via breast milk to the prematurely born infant: a systematic review. Clinical Microbiology and Infection 16: 1172-1178

71. LaFemina, R.L., Hayward, G.S.: Replicative forms of human cytomegalovirus DNA with joined termini are found in permissively infected human cells but not in non-permissive Balb/c-3T3 mouse cells. J Gen Virol 64 (Pt 2): 373 - 389 (1983)

72. Lamberson, H.V., Dock, N.L.: Prevention of transfusion-transmitted cytomegalovirus infection. Transfusion 32: 196-198 (1992)

73. Lanari, M., Lazzarotto, T., Venturi, V., Papa, I., Gabrielli, L., Guerra, B., Landini, M.P., Faldella, G.: Neonatal cytomegalovirus blood load and risk of sequelae in symptomatic and asymptomatic congenitally infected newborns. Pediatrics 117: 76-83 (2006)

74. Lee, J.I., Luxton, G.W., Smith, G.A.: Identification of an essential domain in the herpesvirus VP1/2 tegument protein: the carboxy terminus directs incorporation into capsid assemblons. J Virol 80: 12086-12094 (2006)

75. Lischka, P., Rosorius, O., Trommer, E., Stamminger, T.: A novel transferable nuclear export signal mediates CRM1-independent nucleocytoplasmic shuttling of the human cytomegalovirus transactivator protein pUL69. The EMBO Journal 20: 7271-7283 (2001)

76. Liu, Y., Zhang, Z., Zhao, X., Wei, H., Deng, J., Cui, Z., Zhang, X.E.: Human cytomegalovirus UL94 is a nucleocytoplasmic shuttling protein containing two NLSs and one NES. Virus Res 166: 31-42 (2012)

77. Ljungman, P., Griffiths, P., Paya, C.: Definitions of Cytomegalovirus Infection and Disease in Transplant Recipients. Clinical Infectious Diseases 34: 1094-1097 (2002)

78. Margioula-Siarkou, C., Kalogiannidis, I., Petousis, S., Prapa, S., Dagklis, T., Mamopoulos, A., Prapas, N., Rousso, D.: Cytomegalovirus, Toxoplasma gondii and Rubella Vertical Transmission Rates According to Mid-trimester Amniocentesis: A Retrospective Study. International Journal of Preventive Medicine 6: 32 (2015)

79. McCormick, A.L., Skaletskaya, A., Barry, P.A., Mocarski, E.S., Goldmacher, V.S.: Differential function and expression of the viral inhibitor of caspase 8-induced apoptosis (vICA) and the viral mitochondria -localized inhibitor of

apoptosis (vMIA) cell death suppressors conserved in primate and rodent cytomegaloviruses. Virology 316: 221-233 (2003)

80. Mercorelli, B., Sinigalia, E., Loregian, A., Palu, G.: Human cytomegalovirus DNA replication: antiviral targets and drugs. Rev Med Virol 18: 177-210 (2008)

81. Mettenleiter, T.C.: Budding events in herpesvirus morphogenesis. Virus Res 106: 167-180 (2004)

82. Mettenleiter, T.C.: Herpesvirus assembly and egress. J Virol 76: 1537-1547 (2002)

83. Mettenleiter, T.C., Klupp, B.G., Granzow, H.: Herpesvirus assembly: an update. Virus Res 143: 222-234 (2009)

84. Mocarski E.S.Jr., S.T., Pass R.F.: Cytomegaloviruses. In: Fields Virology,Vol. 2, 5, Lippincott Williams & Wilkins, p. 2702-2772 (2007)

85. Mocarski, E.S.a.C.C.T.: Cytomegalovirus and their replication. In: Fields Virology,Vol. 2, 4, Lippincott-Raven, p. 2629-2675. (2001)

86. Mohl, B.S., Bottcher, S., Granzow, H., Kuhn, J., Klupp, B.G., Mettenleiter, T.C.: Intracellular localization of the pseudorabies virus large tegument protein pUL36. J Virol 83: 9641-9651 (2009)

87. Mothes, W., Sherer, N.M., Jin, J., Zhong, P.: Virus Cell-to-Cell Transmission. J Virol 84: 8360-8368 (2010)

88. Mussi-Pinhata, M.M., Yamamoto, A.Y., do Carmo Rego, M.A., Pinto, P.C.G., da Motta, M.S.F., Calixto, C.: Perinatal or early-postnatal cytomegalovirus infection in preterm infants under 34 weeks gestation born to CMV-seropositive mothers within a high-seroprevalence population. The Journal of Pediatrics 145: 685-688

89. Nigro, G., Adler, S.P., La Torre, R., Best, A.M.: Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. N Engl J Med 353: 1350-1362 (2005)

90. O'Reilly, A.J., Dacks, J.B., Field, M.C.: Evolution of the Karyopherin-β Family of Nucleocytoplasmic Transport Factors; Ancient Origins and Continued Specialization. PLoS ONE 6: 19308 (2 011)

91. Ogawa-Goto, K., Tanaka, K., Gibson, W., Moriishi, E., Miura, Y., Kurata, T., Irie, S., Sata, T.: Microtubule network facilitates nuclear targeting of human cytomegalovirus capsid. J Virol 77: 8541-8547 (2003)

92. Pass, R.F., Fowler, K.B., Boppana, S.B., Britt, W.J., Stagno, S.: Congenital cytomegalovirus infection following first trimester maternal infection: symptoms at birth and outcome. J Clin Virol 35: 216-220 (2006)

93. Pemberton, L.F., Paschal, B.M.: Mechanisms of Receptor-Mediated Nuclear Import and Nuclear Export. Traffic 6: 187-198 (2005)

94. Penkert, R.R., Kalejta, R.F.: Tale of a tegument transactivator: the past, present and future of human CMV pp71. Future virology 7: 855-869 (2012)

95. Perdue, M.L., Cohen, J.C., Kemp, M.C., Randall, C.C., O'Callaghan, D.J.: Characterization of three species of nucleocapsids of equine herpesvirus type-1 (EHV -1) . Virology 64: 187-204 (1975)

96. Phillips, S.L., Bresnahan, W.A.: The human cytomegalovirus (HCMV) tegument protein UL94 is essential for secondary envelopment of HCMV virions. J Virol 86: 2523-2532 (2012)

97. Prichard, M.N., Gao, N., Jairath, S., Mulamba, G., Krosky, P., Coen, D.M., Parker, B.O., Pari, G.S.: A Recombinant Human Cytomegalovirus with a Large Deletion in UL97 Has a Severe Replication Deficiency. J Virol 73: 5663-5670 (1999)

98. R.F., P.: Cytomegalovirus. In: Fields Virology, Fourth Edition,Vol. 2, H.P.L.-R. Knipe DM, p. 2675-2707 (2001)

99. Ramos-Casals, M., Cuadrado, M.J., Alba, P., Sanna, G., Brito-Zeron, P., Bertolaccini, L., Babini, A., Moreno, A., D'Cruz, D., Khamashta, M.A.: Acute viral infections in patients with systemic lupus erythematosus: description of 23 cases and review of the literature. Medicine (Baltimore) 87: 311 -318 (2008)

100. Rasmussen, N.S., Draborg, A.H., Nielsen, C.T., Jacobsen, S., Houen, G.: Antibodies to early EBV, CMV, and HHV6 antigens in systemic lupus erythematosus patients. Scand J Rheumatol 44: 143-149 (2015)

101. Reeves, M., Sinclair, J.: Aspects of human cytomegalovirus latency and reactivation. Curr Top Microbiol Immunol 325: 297-313 (2008)

102. Revello, M.G., Gerna, G.: Diagnosis and Management of Human Cytomegalovirus Infection in the Mother, Fetus, and Newborn Infant. Clin Microbiol Rev 15: 680-715 (2002)

103. Rinaldi, F., Lissandrin, R., Mojoli, F., Baldanti, F., Brunetti, E., Pascarella, M., Giordani, M.T.: Acute cytomegalovirus infection as a cause of venous thromboembolism. Mediterr J Hematol Infect Dis 6: 20140-20141 (2014)

104. Roche, *Fachinformation Cymeven i.v., Wirkstoff Ganciclovir*, Roche, Editor. 2004.

105. Roizman, B., Baines, J.: The diversity and unity of Herpesviridae. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 14: 63-79 (1991)

106. Roizman B., C.L.E., Deinhardt F.: Herpesviridae: definition, provisional nomenclature and taxonomy. Intervirol. 16 201-217 (1981)

107. Roizman B., K.D.M., Whitley R.J.: Herpes simplex viruses. In: Fields Virology, Fifth Edition,Vol. L.W. Wilkins, p. 2501-2601 (2007)

108. Rubin, R.H., Kemmerly, S.A., Conti, D., Doran, M., Murray, B.M., Neylan, J.F., Pappas, C., Pitts, D., Avery, R., Pavlakis, M., Del Busto, R., DeNofrio, D., Blumberg, E.A., Schoenfeld, D.A., Donohue, T., Fisher, S.A., Fishman, J.A.: Prevention of primary cytomegalovirus disease in organ transplant recipients with oral ganciclovir or oral acyclovir prophylaxis. Transplant Infectious Disease 2: 112-117 (2000)

109. Ryckman, B.J., Chase, M.C., Johnson, D.C.: HCMV gH/gL/UL128-131 interferes with virus entry into epithelial cells: evidence for cell type-specific receptors. Proc Natl Acad Sci U S A 105: 14118-14123 (2008)

110. Ryckman, B.J., Jarvis, M.A., Drummond, D.D., Nelson, J.A., Johnson, D.C.: Human cytomegalovirus entry into epithelial and endothelial cells depends

on genes UL128 to UL150 and occurs by endocytosis and low-pH fusion. J Virol 80: 710-722 (2006)

111. Sagedal, S., Nordal, K.P., Hartmann, A., Degre, M., Holter, E., Foss, A., Osnes, K., Leivestad, T., Fauchald, P., Rollag, H.: A prospective study of the natural course of cytomegalovirus infection and disease in renal allograft recipients. Transplantation 70: 1166-1174 (2000)

112. Sampaio, K.L., Cavignac, Y., Stierhof, Y.D., Sinzger, C.: Human cytomegalovirus labeled with green fluorescent protein for live analysis of intracellular particle movements. J Virol 79: 2754-2767 (2005)

113. Sanchez, V., Greis, K.D., Sztul, E., Britt, W.J.: Accumulation of virion tegument and envelope proteins in a stable cytoplasmic compartment during human cytomegalovirus replication: characterization of a potential site of virus assembly. J Virol 74: 975-986 (2000)

114. Sarov, I., Abady, I.: The morphogenesis of human cytomegalovirus. Isolation and polypeptide characterization of cytomegalovirions and dense bodies. Virology 66: 464-473 (1975)

115. Schauflinger, M., Villinger, C., Mertens, T., Walther, P., von Einem, J.: Analysis of human cytomegalovirus secondary envelopment by advanced electron microscopy. Cellular Microbiology 15: 305-314 (2013)

116. Schipke, J., Pohlmann, A., Diestel, R., Binz, A., Rudolph, K., Nagel, C.H., Bauerfeind, R., Sodeik, B.: The C terminus of the large tegument protein pUL36 contains multiple capsid binding sites that function differently during assembly and cell entry of herpes simplex virus. J Virol 86: 3682-3700 (2012)

117. Schmolke, S., Kern, H.F., Drescher, P., Jahn, G., Plachter, B.: The dominant phosphoprotein pp65 (UL83) of human cytomegalovirus is dispensable for growth in cell culture. J Virol 69: 5959-5968 (1995)

118. Scholtz, J.M., Baldwin, R.L.: The Mechanism of alpha-Helix Formation by Peptides. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure 21: 95-118 (1992)

119. Schottstedt, V., Blümel, J., Burger, R., Drosten, C., Gröner, A., Gürtler, L., Heiden, M., Hildebrandt, M., Jansen, B., Montag-Lessing, T., Offergeld, R., Pauli, G., Seitz, R., Schlenkrich, U., Strobel, J., Willkommen, H., von König, C.-H.W.: Human Cytomegalovirus (HCMV) ' Revised. Transfusion Medicine and Hemotherapy 37: 365-375 (2010)

120. Seo, J.Y., Britt, W.J.: Cytoplasmic envelopment of human cytomegalovirus requires the postlocalization function of tegument protein pp28 within the assembly compartment. J Virol 81: 6536-6547 (2007)

121. Serrano, L., Neira, J.-L., Sancho, J., Fersht, A.R.: Effect of alanine versus glycine in [alpha]-helices on protein stability. Nature 356: 453-455 (1992)

122. Sinzger, C.: Entry route of HCMV into endothelial cells. J Clin Virol 41: 174-179 (2008)

123. Sinzger, C., Hahn, G., Digel, M., Katona, R., Sampaio, K.L., Messerle, M., Hengel, H., Koszinowski, U., Brune, W., Adler, B.: Cloning and sequencing of a highly productive, endotheliotropic virus strain derived from human cytomegalovirus TB40/E. Journal of General Virology 89: 359-368 (2008)

124. Sinzger, C., Muntefering, H., Loning, T., Stoss, H., Plachter, B., Jahn, G.: Cell types infected in human cytomegalovirus placentitis identified by immunohistochemical double staining. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol 423: 249-256 (1993)

125. Sissons, J.G., Carmichael, A.J.: Clinical aspects and management of cytomegalovirus infection. J Infect 44: 78-83 (2002)

126. Smith, R.M., Kosuri, S., Kerry, J.A.: Role of Human Cytomegalovirus Tegument Proteins in Virion Assembly. Viruses 6: 582-605 (2014)

127. Sodeik, B., Ebersold, M.W., Helenius, A.: Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. J Cell Biol 136: 1007-1021 (1997)

128. Sorokin, A.V., Kim, E.R., Ovchinnikov, L.P.: Nucleocytoplasmic transport of proteins. Biochemistry (Mosc) 72: 1439 -1457 (2007)

129. Stade, K., Ford, C.S., Guthrie, C., Weis, K.: Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. Cell 90: 1041-1050 (1997)

130. Stagno, S., Whitley, R.J.: Herpesvirus Infections of Pregnancy. New England Journal of Medicine 313: 1270-1274 (1985)

131. Stamminger, T.: Zytomegalievirus-Infektionen nach Transplantationen: Klinische Problematik, Diagnostik und Therapie. Dtsch Arztebl International 94: 168-169 (1997)

132. Stinski, M.F.: Human cytomegalovirus: glycoproteins associated with virions and dense bodies. J Virol 19: 594-609 (1976)

133. Stinski, M.F., Meier, J.L.: Immediate-early viral gene regulation and function. In: Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis,Vol. 1, C.U. Press, (2007)

134. Tandon, R., Mocarski, E.S.: Control of cytoplasmic maturation events by cytomegalovirus tegument protein pp150. J Virol 82: 9433-9444 (2008)

135. Tandon, R., Mocarski, E.S.: Viral and host control of cytomegalovirus maturation. Trends Microbiol 20: 392-401 (2012)

136. Tandon, R., Mocarski, E.S., Conway, J.F.: The A, B, Cs of Herpesvirus Capsids. Viruses 7: 899-914 (2015)

137. Tischer, B.K., Smith, G., Osterrieder, N.: En Passant Mutagenesis: A Two Step Markerless Red Recombination System. In: In Vitro Mutagenesis Protocols,Vol. 634, J. Braman, p. 421-430 (2010)

138. Tischer, B.K., von Einem, J., Kaufer, B., Osterrieder, N.: Two-step red-mediated recombination for versatile high-efficiency markerless DNA manipulation in Escherichia coli. Biotechniques 40: 191-197 (2006)

139. Tooze, J., Hollinshead, M., Reis, B., Radsak, K., Kern, H.: Progeny vaccinia and human cytomegalovirus particles utilize early endosomal cisternae for their envelopes. Eur J Cell Biol 60: 163-178 (1993)

140. Tullman, J.A., Harmon, M.E., Delannoy, M., Gibson, W.: Recovery of an HMWP/hmwBP (pUL48/pUL47) complex from virions of human cytomegalovirus: subunit interactions, oligomer composition, and deubiquitylase activity. J Virol 88: 8256-8267 (2014)

141. Varnum, S.M., Streblow, D.N., Monroe, M.E., Smith, P., Auberry, K.J., Pasa-Tolic, L., Wang, D., Camp, D.G., 2nd, Rodland, K., Wiley, S., Britt, W., Shenk, T., Smith, R.D., Nelson, J.A.: Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome . J Virol 78: 10960-10966 (2004)

142. Wang, J., Loveland, A.N., Kattenhorn, L.M., Ploegh, H.L., Gibson, W.: High-molecular-weight protein (p UL48) of human cytomegalovirus is a competent deubiquitinating protease: mutant viruses altered in its active-site cysteine or histidine are viable. J Virol 80: 6003-6012 (2006)

143. Wang, X., Huang, D.Y., Huong, S.M., Huang, E.S.: Integrin alphavbeta3 is a coreceptor for human cytomegalovirus. Nat Med 11: 515-521 (2005)

144. Wen, W., Meinkotht, J.L., Tsien, R.Y., Taylor, S.S.: Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. Cell 82: 463-473 (1995)

145. White, E.A., Del Rosario, C.J., Sanders, R.L., Spector, D.H.: The IE2 60-kilodalton and 40-kilodalton proteins are dispensable for human cytomegalovirus replication but are required for efficient delayed early and late gene expression and production of infectious virus. J Virol 81: 2573-2583 (2007)

146. Wright, H.T., Goodheart, C.R., Lielausis, A.: Human cytomegalovirus. Morphology by negative staining. Virology 23: 419-424 (1964)

147. Yoneda, Y.: Nucleocytoplasmic protein traffic and its significance to cell function. Genes Cells 5: 777-787 (2000)

148. Yu, D., Silva, M.C., Shenk, T.: Functional map of human cytomegalovirus AD169 defined by global mutational analysis. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 12396-12401 (2003)

149. Yu, X., Shah, S., Lee, M., Dai, W., Lo, P., Britt, W., Zhu, H., Liu, F., Zhou, Z.H.: Biochemical and structural characterization of the capsid-bound tegument proteins of human cytomegalovirus. J Struct Biol 174: 451-460 (2011)

150. Zavattoni, M., Lombardi, G., Rognoni, V., Furione, M., Klersy, C., Stronati, M., Baldanti, F.: Maternal, fetal, and neonatal parameters for prognosis and

counseling of HCMV congenital infection. J Med Virol 86: 2163-2170 (2014)

151. Zheng, C., Brownlie, R., Babiuk, L.A., van Drunen Littel-van den Hurk, S.: Characterization of nuclear localization and export signals of the major tegument protein VP8 of bovine herpesvirus-1. Virology 324: 327-339 (2004)

152. Zheng, C., Brownlie, R., Babiuk, L.A., van Drunen Littel-van den Hurk, S.: Characterization of the Nuclear Localization and Nuclear Export Signals of Bovine Herpesvirus 1 VP22. J Virol 79: 11864-11872 (2005)

# Lebenslauf

## Persönliche Angaben

| | |
|---|---|
| Name | Alexandra Maselbas |

## Werdegang

| | |
|---|---|
| Studium der Humanmedizin | Universität Ulm (seit September 2010) |
| Physikum | Universität Ulm September 2012 |
| 2. Schriftliches Staatsexamen | Universität Ulm April 2016 |
| Stipendienprogramme | Teilnahme am Promotionsprogramm für experimentelle Medizin der Universität Ulm 2014 |
| 3. Staatsexamen | Universität Ulm Mai 2017 |
| Approbation | Mai 2017 |

Ulm den