

Aus dem Departement der Diagnostischen Labormedizin  
des Universitätsklinikum Tübingen

Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie der  
Viruskrankheiten

**Funktionelle Analyse der Entwicklung  
der HCMV-Virostatikaresistenz durch  
die Generierung und Charakterisierung definierter  
HCMV Mutanten**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Imrich, Eike Christian**

**2018**

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. G. Jahn

2. Berichterstatter: Professor Dr. W. Bethge

Tag der Disputation: 08.02.2018

## Abkürzungsverzeichnis

AC	assembly compartment
ARPE-19	humane retinale Pigmentepithelzellen
BAC	bakterielles artifizielles Chromosom
bp	Basenpaare
CDV	Cidofovir
CPE	zytopathischer Effekt
d	Tag
GCV	Ganciclovir
h	Stunde
HCMV	humanes Cytomegalovirus
HFF	humane Vorhautfibroblasten
IE	immediate early
MBV	Maribavir
MEM	Minimal essential Medium
min	Minute
MOI	Multiplicity of infection
ORF	open reading frame
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Foscarnet
PRA	Plaque Reduktions Assay
RFLP	Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus
rpm	Runden pro Minute
s	Sekunde
TBE-Puffer	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TCID50	Tissue Culture Infective Dose 50

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Das Humane Cytomegalovirus . . . . .	1
1.1.1	Zuordnung . . . . .	1
1.1.2	Virusaufbau . . . . .	2
1.1.3	Replikationszyklus . . . . .	3
1.1.4	Epidemiologie . . . . .	5
1.1.5	Pathogenese . . . . .	6
1.2	Antivirale Therapie . . . . .	6
1.2.1	Ganciclovir . . . . .	6
1.2.2	Foscarnet . . . . .	7
1.2.3	Cidofovir . . . . .	8
1.2.4	Maribavir . . . . .	8
1.3	Resistenz gegen Virostatika . . . . .	8
1.3.1	Hinweise auf Resistenz . . . . .	8
1.3.2	Mutationen im viralen Phosphotransferase-Gen UL97 . . . . .	9
1.3.3	Mutationen im viralen Polymerase-Gen UL54 . . . . .	10
1.3.4	Das HCMV-Gen UL44 . . . . .	11
1.3.5	Das HCMV-Gen UL27 . . . . .	12
1.3.6	Detektion von Resistenzen . . . . .	12
1.3.7	Marker Transfer Analyse . . . . .	13
1.4	Zielsetzung der Arbeit . . . . .	15
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>17</b>
2.1	Material . . . . .	17
2.1.1	Patienten . . . . .	17
2.1.2	Zelllinien . . . . .	17
2.1.3	Zellkulturmedien . . . . .	18
2.1.4	Bakterien . . . . .	19
2.1.5	Bakterienkulturmedien . . . . .	19

2.1.6	Bakterielles artifizielles Chromosom . . . . .	20
2.1.7	Virusstämme . . . . .	20
2.1.8	Virostatika . . . . .	21
2.1.9	Reagenzien für die Polymerasekettenreaktion . . . . .	21
2.1.10	Primer für Sequenzierung und Mutagenese . . . . .	21
2.1.11	Lösungen für die Gelelektrophorese . . . . .	27
2.1.12	Reagenzien für den DNA-Verdau . . . . .	28
2.1.13	Reagenzien für die DNA-Isolierung . . . . .	28
2.1.14	Reagenzien für die Immunfluoreszenz-Färbung . . . . .	28
2.1.15	Verbrauchsmaterialien . . . . .	29
2.1.16	Kits . . . . .	30
2.1.17	Kleingeräte . . . . .	30
2.1.18	Großgeräte . . . . .	30
2.2	Genetische Analyse von HCMV-DNA-Isolaten . . . . .	32
2.2.1	Extraktion von HCMV-DNA aus Zellkulturüberstand . . . . .	32
2.2.2	Amplifikation der extrahierten HCMV-DNA mittels Polyme- rasekettenreaktion . . . . .	33
2.2.3	Kontrolle der Polymerasekettenreaktion mittels Gelelektropho- rese . . . . .	33
2.2.4	Sequenzierung der amplifizierten HCMV-DNA durch die Firma GATC Biotech . . . . .	34
2.2.5	Vergleich der HCMV-DNA Sequenzen mit Referenzstämmen AD169, TB40/E und MERLIN mittels Sequenz Alignment . . . . .	34
2.3	Generierung von HCMV-Mutanten mit definierten Punktmutationen mittels en-passant Mutagenese . . . . .	35
2.3.1	Generierung von PCR-Produkten mit definierter Punktmuta- tion, I-Sce-I-Schnittstelle und positivem Selektionsmarker . . . . .	35
2.3.2	Aufreinigung des PCR-Produktes mittels DpnI-Verdau . . . . .	37
2.3.3	Herstellung elektrokompenter <i>E.coli</i> Bakterien mit HCMV- BAC-DNA und Elektroporation . . . . .	38
2.3.4	Entfernung des positiven Selektionsmarkers aus der HCMV- BAC-DNA in <i>E.coli</i> mittels Red-Rekombinase-Protokoll . . . . .	39

2.3.5	Kontrolle der Mutagenese durch Isolierung der rekombinanten HCMV-BAC-DNA mittels Minipräparation und anschließender Sequenzanalyse . . . . .	41
2.3.6	Isolierung der rekombinanten HCMV-BAC-DNA mittels Midi-präparation . . . . .	42
2.4	Anzucht von rekombinanten HCMV-Mutanten in Zellkultur . . . . .	43
2.4.1	Zellkultur für humane Vorhautfibroblasten und humane retinale Pigmentzellen . . . . .	43
2.4.2	Transfektion der rekombinanten HCMV-BAC-DNA in HFF . . . . .	44
2.5	Phänotypische Charakterisierung . . . . .	45
2.5.1	Bestimmung der Multiplicity of Infection und Tissue Culture Infectious Dose 50 . . . . .	45
2.5.2	Bestimmung der Wachstumskinetik durch Wachstumsversuche . . . . .	47
2.5.3	Bestimmung der IC <sub>50</sub> mittels Plaque-Reduktions-Assays . . . . .	47
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>50</b>
3.1	Analyse der HCMV-Isolate . . . . .	50
3.1.1	Extraktion, Amplifikation und Analyse der HCMV-Gene UL27 und UL44 . . . . .	50
3.1.2	Identifikation von putativ Resistenz-assoziierten Mutationen in den HCMV-Genen UL27 und UL44 aus gereinigten HCMV-DNA . . . . .	52
3.2	Generierung von rekombinanten HCMV-Mutanten mit definierten Punktmutationen . . . . .	55
3.2.1	Generierung von PCR-Produkten mit definierten Punktmutationen . . . . .	55
3.2.2	Mutagenese des HCMV-BAC und Kontrolle mittels Sequenzierung . . . . .	55
3.2.3	Rekonstitution der generierten HCMV-Mutanten in Zellkultur . . . . .	58
3.3	Phänotypische Charakterisierung der generierten HCMV-Mutanten . . . . .	61
3.3.1	Charakterisierung der Wachstumskinetik der generierten HCMV-Mutanten . . . . .	61
3.3.2	Charakterisierung des Resistenzverhaltens der rekombinanten HCMV-Mutanten gegen GCV, CDV und PFA mittels PRA . . . . .	63

<b>4 Diskussion</b>	<b>68</b>
4.1 Analyse der HCMV-Isolate . . . . .	68
4.2 Generierung von rekombinanten HCMV-Mutanten mit definierten Punktmutationen . . . . .	70
4.3 Phänotypische Charakterisierung der generierten HCMV-Mutanten .	73
4.3.1 Charakterisierung der Wachstumskinetik der rekombinanten HCMV-Mutanten . . . . .	73
4.3.2 Charakterisierung des Resistenzverhaltens der rekombinanten HCMV-Mutanten gegen GCV, CDV und PFA . . . . .	74
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>77</b>
<b>6 Literaturverzeichnis</b>	<b>79</b>
<b>7 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationschrift</b>	<b>90</b>
<b>8 Veröffentlichungen</b>	<b>91</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Humane Cytomegalovirus

### 1.1.1 Zuordnung

Das humane Cytomegalovirus (HCMV) gehört zur Familie der Herpesviridae, welche auf Grund von Zelltropismus und biologischer Eigenschaften in die drei Subfamilien der  $\alpha$  -,  $\beta$  - und  $\gamma$  -Herpesviridae unterteilt werden (Liu and Zhou; 2007). Von acht Herpesviren ist bekannt, dass sie Menschen infizieren können:

Subfamilie	
$\alpha$ - Herpesviren	Herpes Simplex Virus 1 u. 2 Varizella Zoster Virus
$\beta$ - Herpesviren	HCMV Humanes Herpesvirus 6 u. 7
$\gamma$ - Herpesviren	Ebstein-Barr Virus Humanes Herpesvirus 8

Der Name Cytomegalovirus leitet sich von dem durch eine Infektion ausgelösten zytopathischen Effekt (CPE, vgl. Abbildung 1.1 auf S.2) in Form von intranukleären Einschlusskörperchen ab und wurde von Weller et al. eingeführt (Ho; 2008). Diese histologischen Veränderungen wurden schon im Jahre 1881 von Ribbert in den Nieren eines Totgeborenen beobachtet (Ribbert; 1904). In den 1950er Jahren gelang es schließlich mehreren Arbeitsgruppen HCMV aus humanem Gewebe zu isolieren (Smith; 1956; Wallace et al.; 1956; Weller; 1953).

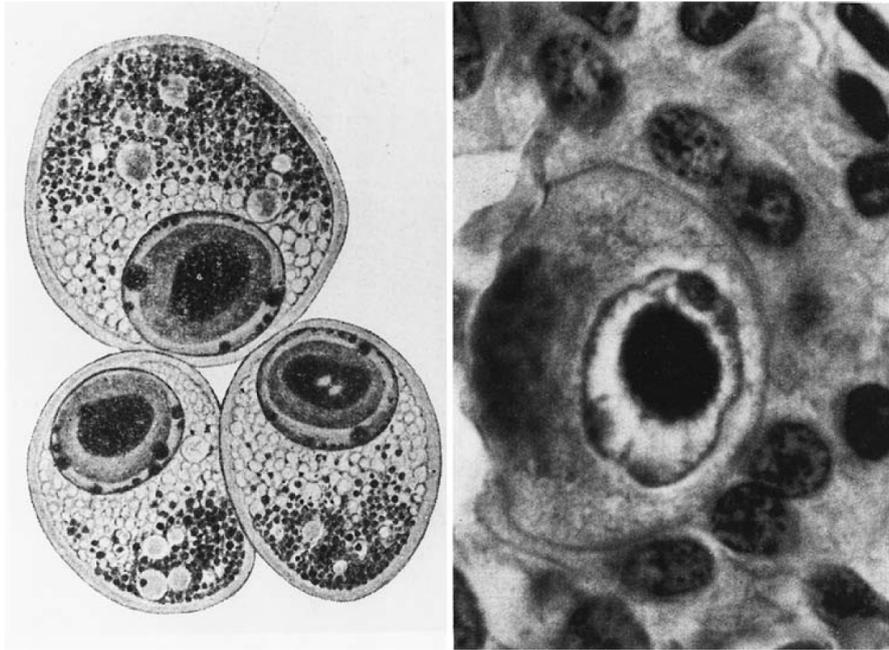


Abbildung 1.1: **Zytopathischer Effekt:** Typische Eulenaugenzellen mit intranukleären Einschlusskörperchen. Abbildung aus (Ho; 2008)

### 1.1.2 Virusaufbau

Das Virion des HCMV ist 200 nm groß und besitzt ein 230 kbp großes Genom, bestehend aus linearer, doppelsträngiger DNA, sowie ein Kapsid, ein Tegument und eine Lipidhülle (vgl. Abbildung 1.2 auf S.3). Die DNA ist von einem ikosaedrischen Kapsid, bestehend aus 162 Kapsomeren, umgeben. Darauf folgt das Tegument, welches diverse virale Proteine zur Modulation des Wirtsmetabolismus sowie zur viralen Replikation beinhaltet. Das Protein pp65 (UL82) kommt am häufigsten vor, allerdings sind mindestens 71 virale Proteine als Bestandteil des HCMV-Tegument beschrieben (Baldick and Shenk; 1996; Jahn et al.; 1987; Varnum et al.; 2004). Als Hülle dienen dem Virus intrazelluläre Wirtszellmembranen, die von viralen Glykoproteinen modifiziert werden. Über diese wird der Eintritt in Zielzellen vermittelt.

HCMV besitzt von den Herpesviren das größte Genom, welches für über 200 virale Proteine kodiert. (Wilkinson et al.; 2015). Weiterhin lassen sich im virale Genom zwei besondere Regionen identifizieren. (vgl. Abbildung 1.3 auf S.3) Diese als Unique long (UL) und Unique short (US) bezeichneten Regionen besitzen bei Laborstämmen eine Länge von etwa 175 kbp (UL) und 38 kbp (US) und werden an ihren Enden

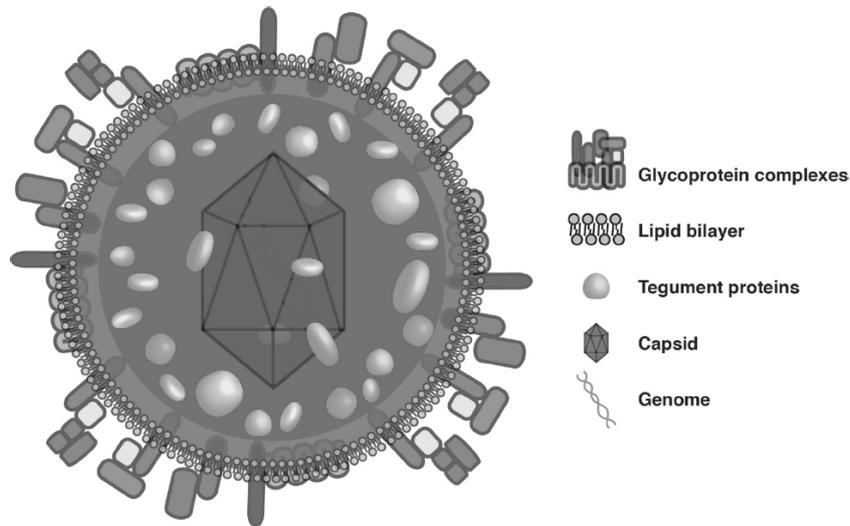


Abbildung 1.2: **HCMV-Partikel**: Das Virion besteht aus dsDNA umgeben von einem Kapsid, dem Tegument und der Lipidhülle. Abbildung aus (Gardner and Tortorella; 2016)

von repetitiven Sequenzen flankiert (Chee and Barrell; 1990). Die beiden benannten Regionen UL und US können im Virion in invertierter Form vorliegen. Somit ergeben sich für HCMV vier Isoformen des Genoms.

### 1.1.3 Replikationszyklus

Abhängig von der Zielzelle verläuft der Eintritt des Virus in diese unterschiedlich. Bei endothelialen und epithelialen Zellen erfolgt die Infektion über Makropinozytose.

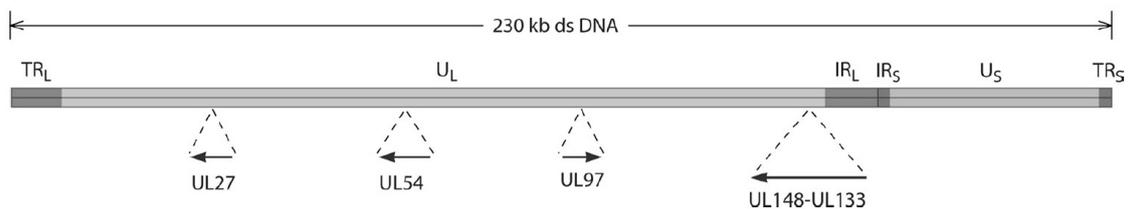


Abbildung 1.3: **Organisation des HCMV-Genoms**: Gezeigt sind die Regionen Unique long und Unique short, welche von repetitiven Sequenzen flankiert werden. Eingezeichnet sind die open-reading frames (ORF) der Gene UL27, UL54 und UL97. Die ORFs UL133-148 zeigen sich nur bei klinischen Isolaten. Abbildung aus (Lurain and Chou; 2010)

Über einen Pentamerkomplex wird hier die Fusion von Virushülle und Endosomenmembran induziert und das virale Kapsid zusammen mit den im Tegument enthaltenen Proteinen in das Zytoplasma freigegeben. (Sinzger et al.; 2008) Im Falle der Infektion von Fibroblasten erfolgt die Penetration über die Zellmembran der Zielzelle. Initial erfolgt die Bindung des viralen Glykoprotein B an Heparansulfat der Wirtszellmembran. Diese Bindung wird durch die Interaktion weiterer viraler Hüllproteine mit Strukturen der Zielzellmembran stabilisiert. Auch hier erfolgt über Fusion beider Membranen die Freisetzung der viralen Bestandteile in die Wirtszelle. Ein Teil der viralen Tegumentproteine und das Viruskapsid werden über Mikrotubuli zum Zellkern transportiert (Sampaio et al.; 2005). Nachdem das virale Erbgut über Kernporen in diesen befördert wurde, schließt die DNA zu einer Ringform und die Genexpression kann beginnen. Diese erfolgt kaskadenartig und kann in immediate-early, early und late Expression eingeteilt werden. Zuerst beginnt die Expression von immediate-early Proteinen. Diese dienen überwiegend zur Transaktivierung der early Genexpression. (Wathen et al.; 1981) Nun erfolgt die Replikation der viralen DNA, da alle für diesen Prozess benötigten viralen Protein von early Genen kodiert werden. Strukturproteine des Virions werden von late Genen kodiert. Die Umstellung von early Expression zu late Expression erfolgt zwischen 24-36 h nach der Infektion. Nach der Formierung fertiger, viraler Kapside erfolgt die Ausschleußung aus dem Zellkern. Diese erfolgt über die Kernmembran. Vermittelt wird dies über einen Komplex aus Emerin, pUL50, pUL53 und weiterer regulatorischer Proteine, unter anderem die virale Serin/Threonin-Phosphotransferase pUL97 (Milbradt et al.; 2014; Tandon and Mocarski; 2012).

Der weitere Reifungsprozess erfolgt im sogenannten zytoplasmatischen *assembly compartment* (AC), welches zuerst von Sanchez et al. beschrieben wurde (Sanchez, Greis, Sztul and Britt; 2000; Sanchez, Sztul and Britt; 2000). Dieses juxt nukleäre Kompartiment entsteht durch die umfangreiche Umgestaltung des sekretorischen Apparates der Zelle (Das and Pellett; 2007, 2011; Das et al.; 2007). Zusätzlich zu den zellulären Komponenten enthält das AC auch virale Struktur- und Tegumentproteine (Alwine; 2012). Im AC erfolgt der Zusammenbau der Viruspartikel. Diese werden über den sekretorischen Weg der Zelle freigesetzt (Tandon and Mocarski; 2012).

Nach der Primärinfektion kommt es zur lebenslangen Persistenz des Virus im Wirts-

organismus. In CD33-positiven und CD34-positiven Zellen des Knochenmarks, sowie CD14-positiven mononukleären Zellen des Blutes kann HCMV eine Latenz ausbilden (Goodrum et al.; 2004; Sinclair and Sissons; 2006). Während dieser Latenzphase werden verschiedene virale Gene exprimiert über die auf die latent infizierte Zelle Einfluss genommen wird (Sissons and Wills; 2015). Die genauen Prozesse sind jedoch noch unbekannt und weitere Forschung ist von Nöten um die Mechanismen der HCMV-Latenz vollständig zu verstehen.

### **1.1.4 Epidemiologie**

HCMV ist weltweit in der menschlichen Population verbreitet, wobei die Seroprävalenz vom sozio-ökonomischen Status und dem Entwicklungsstand des entsprechenden Landes abhängig ist. In Entwicklungsländern erfolgt die Infektion mit HCMV für gewöhnlich früh im Leben und im Erwachsenenalter wird eine Seroprävalenz von annähernd 100% erreicht. In Industriestaaten liegt die Seroprävalenz bei Erwachsenen zwischen 30-60% und steigt mit zunehmendem Alter an (Boppana and Fowler; 2007; Griffiths et al.; 2015). Für Deutschland liegen die Werte bei 30% der 18-20-Jährigen und mehr als 70% der über 65-Jährigen (Hecker et al.; 2004).

HCMV kann sowohl vertikal als auch horizontal übertragen werden. Die Übertragung erfolgt für gewöhnlich über direkten Kontakt mit Körperflüssigkeiten von infizierten Personen wie Speichel, Urin, Blut, Zervixsekret oder Samenflüssigkeit (Melnik et al.; 2011). Der erste Gipfel der horizontalen Übertragung liegt im frühen Lebensalter. Hier erfolgt die Infektion mit HCMV über Speichel oder Urin. Mit Beginn der sexuellen Aktivität lässt sich ein zweiter Gipfel beobachten (Taylor; 2003). Eine wichtige Rolle spielt HCMV in der Transplantationsmedizin, da infektiöses Virus mittels zellulärer Blutprodukte und solider Organe übertragen werden kann. Abhängig vom transplantierten Organ kann in 8-50% der Patienten ohne antivirale Prophylaxe oder Therapie eine HCMV-Erkrankung beobachtet werden (Gilbert and Boivin; 2005). Im Falle der vertikalen Übertragung kann die kongenitale von der postnatalen Infektion unterschieden werden. Die postnatale Infektion erfolgt meist während des Stillens, da es hier zur lokalen Reaktivierung des Virus kommt. In mehr als 90% kann in der Muttermilch HCMV nachgewiesen werden (Hamprecht et al.; 2001, 1998; Maschmann et al.; 2001). Unter den kongenitalen Virusinfektionen hat HCMV die größte Prävalenz

(Melnik et al.; 2011). Die Primärinfektion der Mutter während der Schwangerschaft stellt das größte Risiko für eine Erkrankung des Kindes dar, wobei in knapp einem Drittel dieser Fälle eine Übertragung auf das Kind stattfindet (Britt; 2015; Hamprecht et al.; 2001).

### **1.1.5 Pathogenese**

Nach Kontakt mit infektiösen Körperflüssigkeiten tritt das Virus in die Blutbahn ein und disseminiert in verschiedene Organe des Patienten. Die Ausbreitung über die Blutbahn erfolgt durch die Infektion von mononukleären Phagozyten, über welche die Infektion in die entsprechenden Organe übertragen wird (Jahn et al.; 1999; Melnik et al.; 2011). HCMV besitzt einen breiten Zelltropismus, weswegen jedes Organsystem betroffen sein kann.

Die Virulenz von HCMV ist direkt von der Immunkonstitution des Patienten abhängig. Bei Immunkompetenten verläuft die Primärinfektion meist asymptomatisch, wobei auch vereinzelt Symptome einer Mononukleose oder Hepatitis auftreten können (Mocarski; 2002; Reddehase; 2002). Im Gegensatz dazu ist die Erkrankung immun-kompromittierter Patienten mit Morbidität und Mortalität verbunden (Gilbert and Boivin; 2005; Melnik et al.; 2011). Dies zeigt sich bei AIDS-Patienten, da hier in 85% der Fälle eine HCMV-assoziierte Retinitis auftritt (Griffiths et al.; 2015; Komatsu et al.; 2014). Bei kongenitaler Infektion des Feten führt die Erkrankung zur klassischen Trias von Ikterus, Petechien und Hepatosplenomegalie. Weiterführend kann es auch zur Mikrocephalie, Hörverlust, Pneumonie, Hepatitis und intrakraniellen Blutungen kommen (Buonsenso et al.; 2012).

## **1.2 Antivirale Therapie**

### **1.2.1 Ganciclovir**

Ganciclovir (GCV) ist Mittel erster Wahl zur Behandlung und Prophylaxe von HCMV-Erkrankungen. GCV wird intravenös verabreicht, da die orale Bioverfügbarkeit bei 6% liegt. Als Prodrug zur oralen Therapie wird der L-Valinylester von GCV mit dem Namen Valganciclovir mit einer oralen Bioverfügbarkeit von 60% verwendet

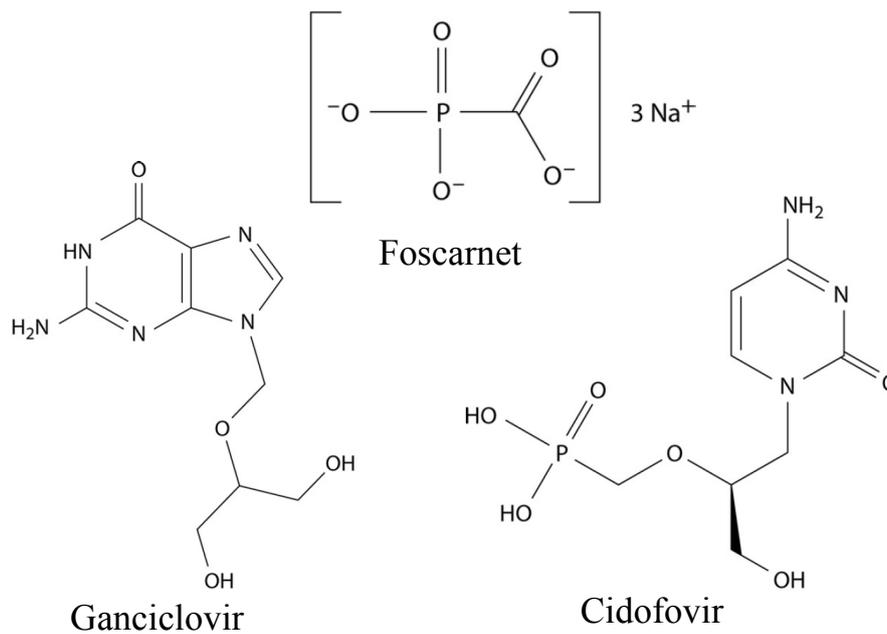


Abbildung 1.4: **Medikamente mit Anti-HCMV Aktivität:** Abbildung modifiziert nach (Lurain and Chou; 2010)

(Gilbert and Boivin; 2005). GCV ist ein Nukleosid-Analogon und die Strukturformel ist in Abbildung 1.4 auf S.7 dargestellt. Es wird nach Eintritt in die infizierte Zelle in mehreren Schritten zu 3-Phosphat-GCV phosphoryliert. Die erste Phosphorylierung erfolgt durch die virale Phosphotransferase pUL97 und die weiteren Schritte durch zelluläre Kinasen. 3-Phosphat-GCV kann nun als aktive Form von der viralen Polymerase pUL54 während der Replikation in die virale DNA eingebaut werden. Hier führt das Therapeutikum zum Kettenabbruch. Dieser Einbau von 3-Phosphat-GCV erfolgt jedoch nicht nur ausschließlich durch die virale Polymerase, sondern kann auch in geringerer Ausprägung durch zelleigene Polymerasen erfolgen. GCV kann dosisabhängig zu Nebenwirkungen wie Neutropenie, Thrombozytopenie, Anämie, Knochenmarkshypoplasie, Diarrhoe und Nierenschäden führen (Schreiber et al.; 2009).

### 1.2.2 Foscarnet

Foscarnet (PFA) benötigt im Gegensatz zu GCV keine vorherige Aktivierung. Die Strukturformel ist in Abbildung 1.4 auf S.7 dargestellt. PFA dient als Pyrophosphat-Analogon und verhindert, dass die virale Polymerase pUL54 über die Spaltung von

Pyrophosphat zwischen Nukleotiden Phosphatbindungen ausbilden kann. Somit kommt es zum Kettenabbruch. Im Vergleich zu GCV kommt es bei der Therapie mit PFA zu schwereren Nebenwirkungen und deswegen wird es vorwiegend als *second-line* Medikament bei Therapieversagen eingesetzt. Typische Nebenwirkungen sind Hypercalciämie, Übelkeit, Erbrechen, Hyperphosphatämie und Anämie (Patel and Paya; 1997).

### **1.2.3 Cidofovir**

Ein weiteres *second-line* Medikament ist Cidofovir (CDV). Hierbei handelt es sich um ein Nukleotid-Analogon, welches über zelleigene Kinasen aktiviert wird und nach Einbau in die virale DNA durch die virale Polymerase pUL54 zum Kettenabbruch führt. Die Strukturformel ist in Abbildung 1.4 auf S.7 dargestellt. CDV wird bei Unverträglichkeit der GCV-Therapie eingesetzt, da es stark nephrotoxisch ist (Bonatti et al.; 2017).

### **1.2.4 Maribavir**

Maribavir (MBV) ist ein antivirales Therapeutikum, welches die HCMV Replikation *in vitro* über die direkte Inhibition der viralen Phosphotransferase pUL97 unterdrückt (Biron et al.; 2002). Kreuzresistenzen mit anderen antiviralen Medikamenten konnten bisher nicht beobachtet werden (Trofe et al.; 2008). In klinischen Phase II Studien zeigte MBV eine effiziente antivirale Wirkung mit niedriger Toxizität (Lurain and Chou; 2010). In einer Phase III Studie mit Stammzelltransplantierten konnte MBV im Vergleich zum Placebo den Ausbruch einer HCMV-Erkrankung nicht verhindern (Marty et al.; 2011).

## **1.3 Resistenz gegen Virostatika**

### **1.3.1 Hinweise auf Resistenz**

Risikofaktoren für die Ausbildung von Resistenzen sind eine starke Immunsuppression, eine hohe Viruslast vor Therapiebeginn, Unterbrechungen der Therapie und eine

verringerte Wirksamkeit, wie beispielsweise durch eine Limitierung der Dosis auf Grund von Nebenwirkungen (Gilbert and Boivin; 2005; Lurain and Chou; 2010). Eine Resistenzentstehung ist zu vermuten, wenn unter adäquater Therapie eine Verschlechterung der Symptome oder eine weiterhin aktive, virale Replikation nachgewiesen werden kann. Je länger die Therapie andauert, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung einer Resistenz (Eckle et al.; 2000; Gilbert and Boivin; 2005). Initial entstehen resistenzvermittelnde Mutationen während der Replikation der viralen DNA. Mutationen im viralen DNA-Polymerase Gen UL54 können Resistenzen gegen GCV, CDV und PFA vermitteln. Wohingegen Mutationen im viralen Phosphotransferase Gen UL97 zur Resistenz gegen GCV führen können. Unter antiviraler Therapie wird die resistente Population selektiert. (Gilbert and Boivin; 2005) Mit zunehmendem Zeitverlauf können auch verschiedene Mutationen akkumulieren und zu verstärkter Resistenz gegen ein einzelnes Medikament bzw. Resistenz gegen verschiedene Therapeutika führen (Lurain and Chou; 2010).

### **1.3.2 Mutationen im viralen Phosphotransferase-Gen UL97**

UL97 hat eine Länge von 709 Codons und kodiert für eine virale Serin/Threonin-Phosphotransferase, welche für Replikation, Zusammenbau des Kapsids und Ausschleusung eine Rolle spielt (Wolf et al.; 2001). pUL97 phosphoryliert unter anderem ein akzessorisches Protein pUL44 der viralen Polymerase und führt darüber zu einer Stabilisierung der Replikationsaktivität. Desweiteren wirkt es sich über die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors pUL69 auf den Export von RNA aus dem Kern der Wirtszelle aus (Krosky et al.; 2003; Marschall et al.; 2011, 2003). pUL97 ist außerdem, wie in Abschnitt 1.1.3 auf S.3 beschrieben, am Export von Kapsiden des Virus aus dem Zellkern beteiligt. Über die Phosphorylierung des Retinoblastomproteins (pRB) durch pUL97 kann sich eine HCMV-Infektion auf den Zellzyklus der Wirtszelle auswirken. (Marschall et al.; 2011) Dadurch kommt es zur Expression von S-Phase Genen und es wird ein der viralen Replikation dienliches Milieu geschaffen (Spector; 2015).

Wie im Abschnitt 1.2.1 auf S.6 beschrieben, ist Aktivierung von GCV durch pUL97 für die Wirksamkeit der Therapie von Nöten. In 94 % der Fälle einer GCV-Resistenz lässt sich diese auf eine Mutation in UL97 zurückführen. Die Region von Aminosäure

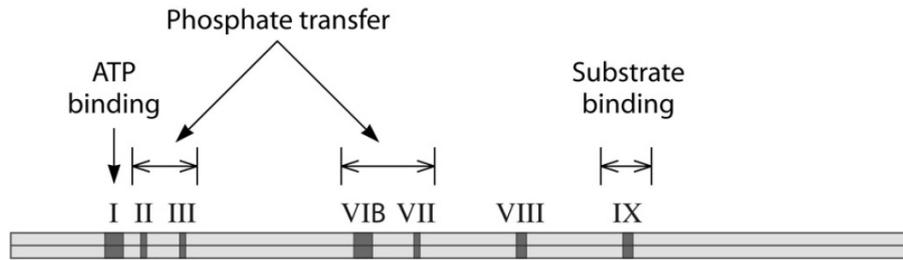


Abbildung 1.5: **Kinaseunterdomäne des UL97-Gens:** Codons der konservierten Regionen: Region I, 338-345; Region II, Lysin 355; Region III, Glutamat 380; Region IVB, 453-462; Region VII, 481-483; Region VIII, 520-527; und Region IX, 574-579. Abbildung aus (Lurain and Chou; 2010)

590-607 ist für die Bindung von GCV wichtig und Mutationen in diesem Bereich beeinträchtigen die anderen Enzymfunktionen nicht (Prichard et al.; 1999; Lurain and Chou; 2010). So finden sich die meisten Resistenzvermittelnden Mutationen zwischen Codon 590 und 607, sowie in Codon 460 und 520 (Chou et al.; 1995; Erice; 1999).

### 1.3.3 Mutationen im viralen Polymerase-Gen UL54

UL54 kodiert für die HCMV-DNA-Polymerase, welche zur Gruppe der  $\alpha$ -Polymerasen gehört und eine Länge von 1243 Codons hat (Shi et al.; 2006). pUL54 verfügt neben der Polymerasefunktion auch über eine Exonukleasefunktion. Acht konservierte Regionen sind für die Polymerasefunktion verantwortlich und drei konservierte Regionen für die Exonukleasefunktion. Es wird davon ausgegangen, dass pUL54 eine komplexe Faltung aufweist, unter der entfernte, konservierte Regionen die aktiven Zentren bilden. (Gilbert and Boivin; 2005) Da die medikamentöse Therapie gegen HCMV diese als Ziel hat, können Mutationen in UL54 zu Resistenzen gegen GCV, PFA und CDV führen. Resistenzen durch eine veränderte virale Polymerase pUL54 lassen sich mit zwei Mechanismen erklären. Als erstes besteht die Möglichkeit, dass eine Mutation in UL54 eine Bindung des antiviralen Agens erschwert oder verhindert. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass schon in die virale DNA integriertes antivirales Agens durch eine verbesserte Exonuklease-Aktivität wieder entfernt wird (Shi et al.; 2006). Resistenzvermittelnde Mutationen in der Domäne der Polymerase-Aktivität führen meist zur Resistenz gegen PFA. (Gilbert and Boivin; 2005). Resistenzvermittelnde

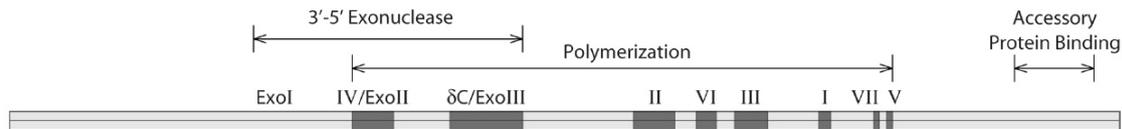


Abbildung 1.6: **DNA-Polymerasegen UL54**: Codons der funktionellen Regionen: Region II/ExoII, 379-421; Region  $\delta$ -C/ExoIII, 492-588; Region II, 696-742; Region VI, 771-790; Region III, 805-845; Region I, 905-919; Region VII, 962-970; und Region V, 978-988. Abbildung aus (Lurain and Chou; 2010)

Mutationen in der Domäne der Exonuklease-Aktivität führen meist zur Resistenz gegen GCV bzw. CDV. Allerdings können auch Mutationen in entfernten Domänen zur Resistenzausbildung durch Veränderung der Konformität der entsprechenden aktiven Zentren beitragen (Shi et al.; 2006). Auf Grund der Wirkmechanismen der Therapeutika scheint es wahrscheinlich, dass Resistenzen gegen GCV bzw. CDV durch eine erhöhte Exonuklease-Aktivität vermittelt werden und Resistenzen gegen PFA durch eine verminderte Affinität der Bindungsstelle verursacht werden (Shi et al.; 2006).

### 1.3.4 Das HCMV-Gen UL44

Das Gen UL44 ist 434 Codons lang und zeigt einen sehr geringen Polymorphismus (Boutolleau et al.; 2009; Woon et al.; 2008). Es kodiert für ein akzessorisches Protein, welches zusammen mit der viralen DNA-Polymerase pUL54, dem Initiatorprotein pUL84, dem DNA-Bindungsprotein pUL57 und dem Primase-Helikase-Komplex, bestehend aus pUL70, pUL102 und pUL105, den Replikationskomplex des Virus bildet (Anders and Gibson; 1988; Woon et al.; 2008). pUL44 bildet Homodimere, welche mit den N-terminalen Enden mit dem C-terminalen Ende der viralen DNA-Polymerase pUL54 interagieren (Sinigalia et al.; 2008; Woon et al.; 2008). So wird die Prozessivität der viralen DNA-Polymerase pUL54 erhöht. (Weiland et al.; 1994) Für die Phosphorylierung des akzessorischen Proteins pUL44 ist die virale Phosphotransferase pUL97 von Nöten (Krosky et al.; 2003; Marschall et al.; 2003). Damit interagiert pUL44 direkt mit den beiden viralen Enzymen, welche für die Vermittlung der antiviralen Resistenz verantwortlich sind (Boutolleau et al.; 2009). Bisher gibt es keine Untersuchungen zur Rolle von UL44 in Zusammenhang mit Resistenzentwicklung.

### 1.3.5 Das HCMV-Gen UL27

Das Gen UL27 ist 609 Codons lang und kodiert für ein virales Protein, über dessen Funktion wenig Informationen vorliegen. Für die Replikation *in vivo* scheint es jedoch nicht erforderlich zu sein (Prichard et al.; 2006). Die Expression von UL27 führt zu einer Hochregulierung des Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitors p21<sup>Cip1</sup> indem der Abbau der Tip60 Acetyltransferase gefördert wird. Dies führt zu einem Arrest des Zellzyklus in der G0/1-Phase (Reitsma et al.; 2011). Allerdings sind die Hochregulierung von p21<sup>Cip1</sup> und der Abbau der Tip60 Acetyltransferase vorübergehende Vorgänge während der HCMV Replikation, wohingegen die Spiegel von pUL27 persistent sind (Hakki and Chou; 2011). In neueren Studien gab es Hinweise auf eine antagonistische Beziehung zwischen pUL27 und pUL97 (Bigley et al.; 2015). Es wurden für UL27 Mutationen beschrieben, welche Resistenzen gegen MBV vermitteln (Chou et al.; 2004; Komazin et al.; 2003). Wildtyp pUL27 ist im Kern der Wirtszelle lokalisiert und Mutationen in UL27, welche zur Resistenz gegen MBV führen, gehen mit einer Exklusion aus dem Zellkern einher. Es wurde gezeigt, dass das C-terminale Ende von pUL27 für die Lokalisation im Zellkern erforderlich ist (Hakki et al.; 2011).

### 1.3.6 Detektion von Resistenzen

Da eine Erkrankung mit resistentem HCMV mit einer schlechteren Prognose einhergeht, ist der frühzeitige und zuverlässige Nachweis von resistenzvermittelnden Mutationen wichtig (Lurain and Chou; 2010). Hierzu werden genotypische und phänotypische Assays herangezogen.

Zu den genotypischen Assays gehören die Sequenzierung, die Light Cycler PCR und die Analyse des Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus (RFLP). Der Vorteil dieser Methoden ist ihre rasche Durchführbarkeit, da sie ohne Anzucht eines Virusisolats in Zellkultur auskommen. Mittels Sequenzierung werden alle Veränderungen der Basensequenz im Vergleich zur Wildtyp Referenzsequenz erfasst. Allerdings muss jede Mutation vorher durch einen phänotypischen Assay beschrieben worden sein, um eine Resistenz definieren zu können, da mittels Sequenzierung nicht zwischen einem Polymorphismus oder einer resistenzvermittelnden Mutation unterschieden werden kann (Lurain and Chou; 2010). Mit Hilfe von Light Cycler PCRs können Mutationen in UL97 nachgewiesen werden. Dafür werden Hybridisierungs sonden

verwendet, die gegen die Wild-Typ-Sequenz von Regionen gerichtet sind, in denen resistenzassoziierte Mutationen gehäuft vorkommen. Bei Mutation zeigt sich ein verringerter Schmelzpunkt in der Schmelzkurvenanalyse, da die mutierte Sequenz und Hybridisierungsprobe nicht übereinstimmen. Verschiedene Mutationen im selben Codon lassen sich hiermit jedoch nicht unterscheiden (Göhring et al.; 2010). Bei der Analyse des RFLP lassen sich einige Mutationen in UL97 über ein verändertes Restriktionsmuster nachweisen (Prix et al.; 1999).

Der Plaque-Reduktion-Assay (PRA) gilt als Goldstandard der phänotypischen Resistenzbestimmung (Chou; 2010; Chou et al.; 2005; Drouot et al.; 2013; Prix et al.; 1998). Hierbei wird das Wachstum des Virus in Anwesenheit einer definierten Verdünnungsreihe an antiviralem Agens mit dem Wachstum unter Abwesenheit antiviraler Substanz verglichen. Als Marker dient hier die Formierung von Plaques aus infizierten Zellen. Abhängig von der Verdünnungsstufe und der Plaque-Formierung lässt sich die Dosis bestimmen, bei der das virale Wachstum um 50% reduziert wird. Diese bezeichnet man als inhibitorische Konzentration 50 ( $IC_{50}$ ). Die Durchführung ist in Abschnitt 2.5.3 auf S.47 beschrieben. Im Gegensatz zu genotypischen Assays sind phänotypische Assays sehr zeitaufwändig, da hierfür ein virales Isolat notwendig ist und die Anzucht lange dauert. Für HCMV dauert der Prozess der phänotypischen Untersuchung vom Zeitpunkt der Gewinnung einer klinischen Probe bis zur endgültigen Auswertung 4-6 Wochen (Lurain and Chou; 2010).

### **1.3.7 Marker Transfer Analyse**

Damit sicher davon ausgegangen werden kann, dass eine bestimmte Mutation ursächlich für die Vermittlung einer Resistenz ist, wird diese Mutation in einen sensitiven Laborstamm eingebracht und die so generierte Mutante phänotypisch charakterisiert. Die Manipulation des HCMV-Genoms erfolgt mit Hilfe eines bakteriellen, artifiziellen Chromosoms (BAC). Hierbei handelt es sich um einen von *E.coli* abgeleiteten Vektor, welcher bis zu 300 kbp an DNA-Sequenzen beinhalten kann. Virus-BACs sind besonders zur Mutagenese geeignet, da diese in Bakterien stabil bleiben. Für HCMV wurde das erste Virus-BAC 1999 entwickelt (Borst et al.; 1999). 2006 wurde die *en-passant* Mutagenese von Tischer et al. beschrieben und 2010 aktualisiert (Tischer et al.; 2006, 2010). Mit dieser Methode ist es möglich, das

virale Genom in der Größenordnung einer einzelnen Punktmutation, Deletion oder Insertion zu verändern, ohne dass andere Fremdsequenzen zurückbleiben. Weiterhin hat die Mutagenese mit Hilfe von Virus-BACs die Vorteile, dass der Erfolg der Mutagenese vor der Rekonstitution in Zellkultur überprüft werden kann und dass nach der Transfektion in humane Vorhautfibroblasten (HFF) nur Virus mit der generierten Mutation rekonstituiert wird.

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

HCMV verursacht, nach klinisch meist inapparenter oder mononukleoseähnlicher Primärinfektion, eine lebenslang persistierende Virusinfektion (Mocarski; 2002; Reddehase; 2002).

Bei immunkompromittierten Patienten nach beispielsweise Organ- oder Knochenmarktransplantation, AIDS-Patienten oder Frühgeborenen kann eine Infektion oder eine Virusreaktivierung aus dem Zustand der Latenz zu lebensbedrohlichen Organmanifestationen führen. Nach allogener Stammzelltransplantation ist HCMV die wichtigste opportunistische Infektion mit einer Inzidenz von 80-85%.

Als HCMV-Chemotherapeutika stehen derzeit GCV, Valganciclovir, CDV und PFA zur Verfügung. Wobei GCV Mittel erster Wahl ist. Experimentell wird derzeit das Virustatikum MBV getestet, dass direkt das UL97-Genprodukt hemmt (Chou et al.; 2012). Resistenzen gegen eben diese Therapeutika können die Behandlung von Betroffenen drastisch erschweren. Molekulare Grundlage der Virostatikaresistenz sind Punktmutationen oder Deletionen im viralen Phosphotransferase-Gen UL97 sowie im viralen Polymerase-Gen UL54. Mehr als 90% der klinischen Isolate mit GCV-Resistenz enthalten Mutationen im UL97-Gen in den Codons 460, 520 und 591-607(Chou; 1999). Neben Mutationen in UL97 können auch Mutationen in UL27 Resistenzen gegen MBV vermitteln (Chou; 2008; Chou et al.; 2012; Hakki et al.; 2011).

Unklar ist derzeit die Rolle anderer Gene, wie z.B. UL27 und UL44, deren Genprodukte mit der viralen Polymerase oder der Phosphotransferase interagieren. Bisherige Untersuchungen zeigten, dass Mutationen im UL27-Gen zu Resistenzen gegenüber MBV führen können. Diese Mutationen zeigten keine Kreuzresistenz mit GCV (Hakki et al.; 2011). Allerdings schließt dies nicht aus, dass andere Mutationen im UL27-Gen zu einer GCV-Resistenz führen könnten. Untersuchungen des UL44-Gens zeigten, dass Mutationen in diesem Gen mit Polymorphismen assoziiert waren (Boutolleau et al.; 2009; Woon et al.; 2008). Die in diesem Zusammenhang untersuchten klinischen HCMV-Stämme waren allerdings von Patienten, die keine antivirale Therapie erhalten hatten bzw. von Patientenstämmen, die zusätzlich UL97-Mutationen beinhalten. Neu auftretende Mutationen müssen über Marker-Transfer-Analysen auf Ihre Fähigkeit Resistenzen gegenüber den bekannten Virostatika auszulösen, überprüft

werden.

Eine Methode für die Generierung rekombinanter Viren wurde von Tischer et al., 2006 publiziert und 2010 aktualisiert (Tischer et al.; 2010, 2006). Mit dieser Technik ist es möglich, gezielt Mutationen in eine Wildtypsequenz einzubringen ohne zusätzliche Fremdsequenzen in das Genom einzuführen. Da bei Anwendung der *en-passant*-Technologie die Generierung der rekombinanten Viren gezielt in *E. coli* durchgeführt wird, steigt die Frequenz homologer Rekombinationsereignisse und somit auch die Ausbeute an rekombinanten Virusstämmen stark an. Weitere Vorteile dieser Methode sind, dass man sowohl Punktmutationen als auch Deletionen oder Insertionen in das klonierte Genom einführen kann. Die manipulierten Genome können vor der Virusrekonstruktion charakterisiert werden und die Transfektion des mutierten Genoms in permissive Zellen resultiert ausschließlich in Virusmutanten, die frei von parentaler Viruskontamination sind (Tischer et al.; 2010, 2006).

Die Untersuchung von HCMV-Isolaten von Patienten mit kongenitaler HCMV-Infektion und Patienten nach Stammzelltransplantation am Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten, Tübingen zeigten in einigen Fällen phänotypisch eine Resistenz gegenüber GCV, ohne dass eine Mutation im UL97- oder UL54-Gen nachgewiesen werden konnte. Bei diesen Isolaten sollten die viralen Gene UL27 und UL44 sequenziert werden. So festgestellte, noch unbeschriebene Mutationen sollten mittels der *en-passant*-Technologie in ein HCMV-Referenz-Genom eingebracht werden (Tischer et al.; 2010, 2006). Die resultierenden Rekombinanten sollten danach funktionell bezüglich der Replikationskinetik und der Chemotherapeutikasuszeptibilität charakterisiert werden. Desweiteren sollten die unbeschriebenen UL97-Mutationen P468Q und A619V phänotypisch charakterisiert werden, welche am Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten, Tübingen detektiert wurden (Fischer et al.; 2016). Die rekombinante Phänotypisierung von neuen Virusmutanten im UL27/UL44/UL97-Gen ist notwendig, um die kausale Assoziation zwischen Mutation und Resistenz herstellen zu können, was wiederum von hoher klinischer Relevanz bezüglich möglicher Therapieoptionen ist (Boutolleau et al.; 2009; Chou; 2010; Chou et al.; 2008; Lurain and Chou; 2010).

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Patienten

Patient 1 mit blastischem NK-Zell Lymphom erhielt eine allogene Stammzelltransplantation von einem HLA-identischen, nicht verwandten Donor. Ein Prophylaxe mit Aciclovir wurde nach Detektion von niedrigen HCMV-DNA-Titern auf GCV umgestellt. Trotzdem stieg die Viruslast weiter an (Göhring et al.; 2013).

Patient 2 ist ein zwei Monate altes Kind mit kongenitaler HCMV-Infektion. Mittels Sequenzanalyse wurde die UL97-Mutation A619V im Blut nachgewiesen (Fischer et al.; 2016).

Patient 3 ist ein 15 Jahre alter HCMV-positiver Patient nach Knochenmarkstransplantation. Durch Immunsuppression erfolgte die Reaktivierung von HCMV vor der Transplantation und führte zu einer disseminierten Infektion. Die UL97-Mutation P468Q wurde in Plasma und Leukozyten nachgewiesen (Fischer et al.; 2016).

Die restlichen 11 Isolate (P6, P7, P8, P9, P10, P15, P20, P26, P27, P31, P41) stammten aus einer anonymisierten Studie von kongenital HCMV-infizierten Kindern unter GCV-Therapie und wurden vom Labor Enders, Stuttgart bereitgestellt.

#### 2.1.2 Zelllinien

Humane Vorhautfibroblasten (HFF) wurden als primäre Zelllinie am Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten, Tübingen, propagiert und zwischen Passage 9 und 30 verwendet.

Humane retinale Pigmentepithelzellen (ARPE-19) wurden von ATCC bezogen und zwischen Passage 15 und 30 verwendet.

### 2.1.3 Zellkulturmedien

Fötales Kälberserum (FCS)	Komplementinaktiviert: 1h; 56°C (Gibco)
Eagle Minimum Essential Medium (MEM)	+Glutamax-I (Gibco) + 5% FCS + 1% Penicillin/Streptomycin
Dulbecco's Modified Eagle Medium- F12	(ATCC) + 5% FCS (Gibco) + 1% Penicillin/Streptomycin
Phosphatgepufferte Saline (PBS)	(PAA)
Typsin 1x	(PAA)
Penicillin/Streptomycin	(PAA)
Einfrriermedium	13ml MEM + 10% FCS 10ml FCS 7,5ml DMSO
MBS-Medium	MEM 6% Solution 3 des Stratagene Mammalian Transfection Kits
2x Hepes	50mM Hepes 1,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 280mM NaCl pH 7,13

Glyceol Shock Solution	20% Glycerol
	50% 2x Hepes
	30% dH <sub>2</sub> O
	sterilfiltriert

## 2.1.4 Bakterien

Der *E.coli* Stamm GS1783 wurde freundlicherweise von Gregory Smith (Northwestern University, Chicago) bereitgestellt und trägt in seinem Genom einen defekten  $\alpha$ -Prophagen. Darüber werden drei Gene, genannt *exo*, *beta* und *gam*, kodiert, welche zur homologen Rekombination führen können. Die Expression dieser Gene wird durch einen temperatursensitiven Promotor reguliert. Darüberhinaus wurde ein für die Endonuklease I-Sce-I kodierendes Gen, welches ursprünglich aus *Saccharomyces cerevisiae* isoliert wurde in das Genom von GS1783 integriert. Kontrolliert wird die Expression dieses Gens durch einen Arabinose-induzierbaren Promotor (Tischer et al.; 2010).

## 2.1.5 Bakterienkulturmedien

LB-Medium	(Genaxxon)
	10 g/l Trypton
	10 g/l NaCl
	5 g/l Hefeextrakt
	ad 1 l Aqua bidest.

LB-Agar	(Roth)
	10 g/l Trypton
	5 g/l Hefeextrakt
	10 g/l NaCl
	15 g/l Agar-Agar
	ad 1 l Aqua bidest.

Antibiotika	Kanamycin (Q-Bio Gene): Stammlösung 50 mg/ml, 1:1000 eingesetzt Chloramphenicol (Q-Bio Gene): Stammlösung 10 mg/ml, 1:400 eingesetzt
Glycerolstocks	700 µl Übernachtkultur 300 µl 50%-ige Glycerollösung, sterilfiltriert

### 2.1.6 Bakteriell-artifizielles Chromosom

Das in *E.coli* GS1783 transformierte bakterielle artifizielle Chromosom (BAC) TB40-BAC<sub>KL7</sub>-UL32EGFP wurde freundlicherweise von Christian Sinzger (Universitätsklinikum Ulm, Ulm) bereitgestellt und enthält das Genom des HCMV-Laborstammes TB40/E. Die Region im HCMV-Genom zwischen US2 und US6 ist für die HCMV-Replikation in Zellkultur nicht erforderlich. Hier wurde der BAC-Vektor integriert, welcher über ein Chloramphenicol-Resistenzgen verfügt. So können BAC-tragende *E.coli* selektiert werden. TB40-BAC<sub>KL7</sub>-UL32EGFP enthält weiterhin ein EGFP-Gen, dessen Sequenz an UL32 fusioniert wurde. So führt die Expression des Matrixproteins pUL32(pp150) zu der Synthese des C-terminalen Fusionsproteins pUL32EGFP (Sampaio et al.; 2005). Wenn nach Transfektion humaner Zellen mit TB40-BAC<sub>KL7</sub>-UL32EGFP die virale Replikation induziert wird, bilden sich Nachkommenviren mit integriertem pUL32EGFP. Darüber sind die Virionen als grüne Punkte in der Fluoreszenzmikroskopie zu erkennen. TB40/E repliziert sowohl in Endothelzellen, Epithelzellen und Fibroblasten, weswegen es für den Co-kultur Plaque-Reduktions-Assay zur phänotypischen Charakterisierung geeignet ist (Sinzger et al.; 2008).

### 2.1.7 Virusstämme

Für die Durchführung der phänotypischen Charakterisierung wurden die mittels en-passant Mutagenese generierten HCMV-Stämme verwendet. Als Referenz diente

der Stamm HCMV-TB40-BAC<sub>KL7</sub>-UL32EGFP.

### 2.1.8 Virostatika

GCV (Stammlösung 196 mM)	(Roche)
PFA (Stammlösung 80 mM)	(Astra Zeneca)
CDV (Stammlösung 270 mM)	(Gilead Sciences)

### 2.1.9 Reagenzien für die Polymerasekettenreaktion

Pwo Master	(Roche)
	25U Pwo <sup>SuperYield</sup> DNA Polymerase
	4 mM MgCl <sub>2</sub>
	1,6 mM dNTPs
	∑ 250 µl

Primer	(Biolabs)
--------	-----------

### 2.1.10 Primer für Sequenzierung und Mutagenese

Tabelle 2.5: Sequenzierungsprimer UL27

	Bezeichnung	Sequenz 5'-3'
UL27	1f	gaaaacggcgtacatga
UL27	1r	catgtacctggcctctaa
UL27	2f	cctttaaacagcctgatg
UL27	2r	gttgctcgattacaagac
UL27	3f	cgtagaggtccttcaat
UL27	3r	agttttgtcaccagttc

Tabelle 2.6: Sequenzierungsprimer UL44

	Bezeichnung	Sequenz 5'-3'
UL44	1F	catgtcgggtggcagtga
UL44	1R	acgtgactcaattccgtgtataa
UL44	2F	gtccggccagtcaagaaa
UL44	2R	gggaacagcggcaaadc
UL44	3F	cttgtgctgctctatt
UL44	3R	tcgtgtgctctctataaac

Tabelle 2.7: Sequenzierungsprimer UL97

	Bezeichnung	Sequenz 5'-3'
UL97	595 <i>forward</i>	cctcatgcccgtgtggacc (Prix et al.; 1999)
UL97	595 <i>reverse</i>	ccatgctcgcccaggagaca (Prix et al.; 1999)
UL97	460 <i>forward</i>	gttggccgacgctatcaaat (Prix et al.; 1999)

Tabelle 2.8: Mutageneseprimer UL27

	Bezeichnung	Sequenz 5'-3'
en-passant Mutagenese	mA20D <i>forward</i>	ccgccgcctccactgccaaccagc agccggaggag- caggAtaaagaaga ccatgacgacgaggatgacgacgat aagtaggg Austausch C nach A
en-passant Mutagenese	mA20D <i>reverse</i>	cgcgaaataggcgtcgtcaccgtc gtcatggtcttctttaTctgctcc tccggctgctggcaaccaattaacca attctgattag Austausch G nach T

en-passant Mutagenese	mA20D <i>forward short</i>	ccgccgcctccactgccaacc
en-passant Mutagenese	mA184V <i>forward</i>	gagatcagtcgtgccgccaacgca tcgctctggccgtggTcacggggca atacgtggtgtaggatgacgacgat aagtaggg Austausch C nach T
en-passant Mutagenese	mA184V <i>reverse</i>	tcttgaatcgagcaacgtgcacac cacgtattgccccgtgAccacggcc agagcgatgcgtcaaccaattaacc aattctgattag Austausch G nach A
en-passant Mutagenese	mA184V <i>forward short</i>	gagatcagtcgtgccgcaaaa
en-passant Mutagenese	mA558D <i>forward</i>	ttcagctcggcgctctcggacgccg agctgagcaaccacgAcaaccgctg ccgccgcaaggaggatgacgacgat aagtaggg Austausch C nach A
en-passant Mutagenese	mA558D <i>reverse</i>	cgggcccagttccagcggggcctt gcggcggcagcggttgTcgtggtg ctcagctcggcgcaaccaattaacc aattctgattag Austausch G nach T
en-passant Mutagenese	mA558D <i>forward short</i>	ttcagctcggcgctctcggac
en-passant Mutagenese	mInsT28 <i>forward</i>	ttcctctcagtcatgaaccccgtgg atcagccgccgctTccactgcca cccagcagccggaggatgacgacga taagtaggg Insertion T

en-passant Mutagenese	mInsT28 <i>reverse</i>	ggctctcttagcctgctcctcgg ctgctgggttggcagtggAaggcgg cggctgatccacgcaaccaattaac caattctgattag Insertion A
en-passant Mutagenese	mInsT28 <i>forward short</i>	ttctctcagtcataacccc
en-passant Mutagenese	universal KAN <i>reverse</i>	caaccaattaaccaattctga

Tabelle 2.9: Mutageneseprimer UL44

	Bezeichnung	Sequenz 5'-3'
en-passant Mutagenese	mInsA12 <i>forward</i>	tccttagtcgagacttgcacgctgt ccgggatggatcgcaaAgacgcgcc tctcggagccgacagatgacgacga taagtaggg Insertion A
en-passant Mutagenese	mInsA12 <i>reverse</i>	tcagccgcagcgcagcgtcggcgg ctccgagaggcgcgtcTttgcgac catccggacagccaaccaattaac caattctgattag Insertion T
en-passant Mutagenese	mInsA12 <i>forward short</i>	tccttagtcgagacttgcacg
en-passant Mutagenese	mInsC8 <i>forward</i>	cgctccttagtcgagacttgcacgc tgtccggatggatcCgcaagacgc gcctctcggagcagatgacgacga taagtaggg Insertion C

en-passant Mutagenese	mInsC8 <i>reverse</i>	gccgcagcgcaccagcgtcggcggctc cgagaggcgcgtcttgcGgatccat cccggacagcgtgcaaccaattaac caattctgattag Insertion G
en-passant Mutagenese	mInsC8 <i>forward short</i>	cgctccttagtcgagacttgc
en-passant Mutagenese	mInsT23 <i>forward</i>	acttgacgctgtccgggatggatc gcaagacgcgcctctTcggagccgc cgacgctggcgcaggatgacgacga taagtaggg Insertion T
en-passant Mutagenese	mInsT23 <i>reverse</i>	tcttgtagcggcttcagccgcagcgc cagcgtcggcggctccgAagaggcg cgtcttgcatccaaccaattaac caattctgattag Insertion A
en-passant Mutagenese	mInsT23 <i>forward short</i>	acttgacgctgtccgggatg
en-passant Mutagenese	mR6G <i>forward</i>	gtcgagacttgacgctgtccggga tggatcgcaagacgGgcctctcgga gccgccgacgcaggatgacg acgataagtaggg Austausch C zu G
en-passant Mutagenese	mR6G <i>reverse</i>	acggcttcagccgcagcgcaccagcgt cggcggctccgagaggcCcgtcttg cgatccatcccgaaccaat taaccaattctgattag Austausch G zu C
en-passant Mutagenese	mR6G <i>forward short</i>	gtcgagacttgacgctgtcc

en-passant Mutagenese	mR6GInsT23 <i>forward</i>	acttgacgctgtccgggatggatc gcaagacgGg- cctctTcggagccgc cgacgctggcgcaggatgacgacga taagtaggg Austausch C zu G; In- sertion T
en-passant Mutagenese	mR6GInsT23 <i>reverse</i>	tcttgtaaggcttcagccgcagcgc cagcgtcggcggct- ccgAagaggeC cgtcttgcgatcccaaccaattaac caattctgattag Insertion A; Austausch G zu C
en-passant Mutagenese	mR6GInsT23 <i>forward short</i>	acttgacgctgtccgggatg
en-passant Mutagenese	universal KAN <i>reverse</i>	caaccaattaaccaattctga

Tabelle 2.10: Mutageneseprimer UL97 (Fischer et al.; 2016)

	Bezeichnung	Sequenz 5'-3'
en-passant Mutagenese	mP468Q <i>forward</i>	tttgatattacacccatgaacgtgc tgatcgacgtgaaccAgcacaaccc cagcgagatcgaggatgacgacgat aagtaggg Austausch C nach A

en-passant Mutagenese	mP468Q <i>reverse</i>	aatcgcacagcgcggcgcgcacgat ctcgctggggttgtgcTggttcacg tcgatgagcacgcaaccaattaacc aattctgattag Austausch G nach T
en-passant Mutagenese	mP468Q <i>forward short</i>	tttgatattacacccatgaac
en-passant Mutagenese	mA619V <i>forward</i>	atgggtacggaggcgttgctcttta agcacgccggcgcggTctgccgcgc gttggagaacgaggatgacgacgat aagtaggg Austausch C nach T
en-passant Mutagenese	mA619V <i>reverse</i>	ggagcagtgcgtgagcttgccgttc tccaacgcgcggcagAccgcgccgg cgtgcttaaagcaaccaattaacca attctgattag Austausch G nach A
en-passant Mutagenese	mA619V <i>forward short</i>	atgggtacggaggcgttgctc

### 2.1.11 Lösungen für die Gelelektrophorese

Elektrophoresepuffer (5x TBE-Puffer) 54 g Tris-Base, 121,4 g/mol (Sigma)  
27,5 g Borsäure, 61,83 g/mol (Merck)  
4,3 g EDTA-Dinatrium-Dikalium-Salz  
ad 1 l dH<sub>2</sub>O  
pH 8,0

Für die Gelelektrophorese wurde 0,5x  
TBE-Puffer verwendet.

SeaKemLE Agarose	(Lonza)
Midori Green Advanced	(Biozym)
1 kbp Ladder	(Invitrogen)
123 bp Ladder	(Invitrogen)

### 2.1.12 Reagenzien für den DNA-Verdau

DpnI	(NewEngland Biolabs)
10x Puffer (4)	(NewEngland Biolabs)

### 2.1.13 Reagenzien für die DNA-Isolierung

Ethanol 70% und 100%	(Merck)
Phenol/Chlorophorm/Isoamylalkohol	(Roth)
Proteinase K Stammlösung 20 mg/ml	(Promega)
TE-Puffer	(Macherey-Nagel)

### 2.1.14 Reagenzien für die Immunfluoreszenz-Färbung

Primärantikörper anti-p72	(Argene) immediate early monoklonarer IgG-Maus-Antikörper (Klon E13) eingesetzt 1:1000 in PBS
Primärantikörper anti-pp65	(CINA-Pool) early-late monoklonaler IgG-Maus-Antikörper eingesetzt 1:250 in PBS

Sekundärantikörper	(Dianova) Cy3-gelabelter Ziege- anti-Maus-Antikörper eingesetzt 1:300 in PBS
DAPI (4',6'-Diamin-2-phenylindol)	(Hoechst) eingesetzt 1:10000 in PBS
Aceton 80%	(AppliChem)

### 2.1.15 Verbrauchsmaterialien

6-well Gewebekulturflaschen	(Greiner)
96 well Gewebekulturflaschen	(Greiner)
Cryotubes 2 ml	(Greiner)
Elektroporationsküvetten 2 mm	(Peqlab)
Falcon Tubes 15 ml	(Beckton-Dickinson)
Falcon Tubes 50 ml	(Beckton-Dickinson)
Neubauer Zählkammer	(NanoEnTek)
Phase Lock Gel Heavy Gefäße 2 ml	(5 Prime)
Pipettenspitzen mit Filter 10-1000 µl	(Starlab)
Polypropylenröhrchen 14 ml	(Greiner)
Polystyroltubes 3,5 ml	(Sarstedt)
Reaktionsgefäße 0,2 ml, 0,5 ml	(Sarstedt)
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml	(Eppendorf)
Spritzen 50 ml	(Becton-Dickinson)
Sterilfilter 0,22 µm, 0,45 µm	(Sartorius)
Stripetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	(Costar)
Zellkulturschale 25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup>	(Greiner)

### 2.1.16 Kits

Nucleospin Extract II	(Macherey-Nagel)
Nucleospin Plasmid	(Macherey-Nagel)
Nucleobond Xtra Midi	(Macherey-Nagel)
Mammalian Transfection Kit Solution 1	(Stratagene) 2,5 M CaCl <sub>2</sub>
Mammalian Transfection Kit Solution 2	(Stratagene) 2xBBS, pH 6,95 50 nM N, N-bis(2-hydroxyethyl)- 2-aminoethansulfonacid gepufferte Saline, 280 nM NaCl und 1,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Mammalian Transfection Kit Solution 3	(Stratagene) 2 mg/ml DEAE-dextran in 0,9 % NaCl
QIAmp DNA Blood Mini Kit	(Qiagen)

### 2.1.17 Kleingeräte

Gelelektrophoresekammer	(Hyabid)
Heizblock	(Heidolph)
Mikrowelle	(AEG)
Photometer	(Eppendorf)
Vortex	(Heidolph)

### 2.1.18 Großgeräte

Axiovert 200 Mikroskop	(Zeiss)
Brutschrank	(Labotech, Heraeus)
Elektroporator	(Easyjet Optima Equi Bio)

Heizbad	(GFL)
Invers-Mikroskop ID O2	(Zeiss)
Peltier Thermal Cyclers 200	(MJ Research)
Schüttler	(B.Braun Biotech International)
Sicherheitsarbeitsbank	(BDK)
UV-Transluminator	(Bachhofer)
Zentrifuge Varifuge 3.0RS	(Heraeus)
Zentrifuge Eppendorf 5415D	(Eppendorf)
Zentrifuge Eppendorf 5417R	(Eppendorf)
Zentrifuge Sorvall RC-5B; Rotor SS34	(DuPont)
Zentrifuge Rotina 48R	(Hettich)

## 2.2 Genetische Analyse von HCMV-DNA-Isolaten

### 2.2.1 Extraktion von HCMV-DNA aus Zellkulturüberstand

Mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit der Firma Qiagen wurde virale DNA aus 200 µl jeder der 12 Zellkulturüberstände isoliert.

Dazu wurden 20 µl Proteinase K auf den Boden eines 1,5 ml Reaktionsgefäßes gegeben. Nun wurden 200 µl der Probe und dann 200 µl des Puffers AL hinzugegeben und der Ansatz mittels Vortex für 15 s gemischt. Im Anschluss folgte eine Inkubation bei 56°C für 10 min im Heizblock. Es folgte eine kurze Zentrifugation um etwaige Rückstände im Deckel zu entfernen. 200 µl 96%-iges Ethanol wurde hinzugegeben und der Ansatz für 15 s mittels Vortex gemischt. Es folgte wieder eine kurze Zentrifugation um etwaige Rückstände im Deckel zu entfernen. Eine QIAamp Mini Spin Säule wurde in ein 2 ml Auffangröhrchen gegeben und der Ansatz wurde vorsichtig aufgetragen, ohne den Rand zu benetzen. Die Kappe wurde geschlossen und es folgte eine Zentrifugation bei 6000 x g für 1 min. Die QIAamp Mini Spin Säule wurde in ein frisches 2 ml Auffangröhrchen überführt und das alte Röhrchen wurde mitsamt Filtrat verworfen. Nun wurden 500 µl Puffer AW1 auf die Säule gegeben und bei 6000 x g für 1 min zentrifugiert. Im Anschluss wurde die QIAamp Mini Spin Säule in ein frisches 2 ml Auffangröhrchen überführt und das alte Röhrchen wurde mitsamt Filtrat verworfen. Nun wurde 500 µl Puffer AW2 auf die Säule gegeben. Die anschließende Zentrifugation erfolgte bei 20000 x g für 3 min. Nun wurde ein weiteres Mal die QIAamp Mini Spin Säule in ein frisches 2 ml Auffangröhrchen überführt und das alte Röhrchen wurde mitsamt Filtrat verworfen. Nun erfolgte die Zentrifugation bei 20000 x g für 1 min. Die QIAamp Mini Spin Säule wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und das 2 ml Auffangröhrchen wurde mitsamt Filtrat verworfen. Auf die QIAamp Mini Spin Säule wurden 200 µl ddH<sub>2</sub>O gegeben und der Ansatz bei Raumtemperatur für 1 min inkubiert. Dann erfolgte die Zentrifugation bei 6000 x g für 1 min. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

## 2.2.2 Amplifikation der extrahierten HCMV-DNA mittels Polymerasekettenreaktion

Im Vorfeld der Sequenzierung erfolgte eine Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Amplifizierung der Genregion von UL27 bzw. UL44. Dafür wurden die Primer wie in Abschnitt 2.1.10 auf S.21 beschrieben, verwendet.

Die Ansätze setzten sich wie folgt zusammen:

extrahierte DNA	5 µl
Primer forward	1 µl
Primer reverse	1 µl
Pwo Master	25 µl
ad ddH <sub>2</sub> O	18 µl
<hr/>	
Σ	50 µl

Die Amplifikation erfolgte mit folgendem Programm:

Initiale Denaturierung 93°C 3 min

35 Zyklen:

Denaturierung 94°C 30 s

Annealing 57°C 1 min

Elongation 72°C 1 min

Terminale Elongation 72°C 7 min

PCR-Produkte wurden mit dem Kit NucleoSpin Extract II der Firma Macherey-Nagel aufgereinigt und in 50 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst. Die Ansätze wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

## 2.2.3 Kontrolle der Polymerasekettenreaktion mittels Gelelektrophorese

Zur Erfolgskontrolle der PCR wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei wurde 1%-iges Agarose-Gel verwendet. Agarose wurde in 0,5% TBE-Puffer aufgelöst

und bis zum Kochen in einer Mikrowelle erhitzt. Zur Visualisierung der DNA wurde 1 µg/µl Midori-Green hinzugegeben. Zur Kontrolle der Fragmentgröße der DNA wurde die erste Tasche mit einer 1 kbp Ladder und die letzte Tasche mit einer 123 bp Ladder beladen. Die Ladung der DNA auf das Agarose-Gel erfolgte als Mischung mit 10 µl Probe mit 2 µl Ladepuffer.

#### **2.2.4 Sequenzierung der amplifizierten HCMV-DNA durch die Firma GATC Biotech**

Von jedem aufgereinigten PCR-Produkt wurden 5 µl in 45 µl ddH<sub>2</sub>O verdünnt und die DNA-Konzentration im Photometer bei 260 nm gemessen. Der Ansatz wurde auf eine Konzentration von 20 ng/µl eingestellt. Zu 5 µl DNA wurden 5 µl des forward primer (10 pmol) gegeben. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma GATC Biotech, Konstanz. Die Sequenzen wurden mit dem Programm Chromas ausgewertet.

#### **2.2.5 Vergleich der HCMV-DNA Sequenzen mit Referenzstämmen AD169, TB40/E und MERLIN mittels Sequenz Alignment**

Zur Suche nach putativ resistenzvermittelnden Mutationen wurden die UL27 und UL44 Sequenzen der HCMV-Isolate mittels Multiple Sequenz Alignment mit den Sequenzen der Laborstämme AD169, TB40/E und MERLIN verglichen. Die Daten wurden vom National Center for Biotechnology Information, Bethesda bezogen. Die Kennungen der genetischen Datenbank waren wie folgt:

AD196	GenBank: FJ527563.1
MERLIN	NCBI Reference Sequence: NC_006273.2
TB40/E	GenBank: KF297339.1

Zur Durchführung der Sequenz Alignments wurde das Programm ClustalOmega verwendet. (Sievers et al.; 2011) Dieses lief über die Webserver des European Bioin-

formatics Institute (EMBL-EBI), Hinxton. Anschließend wurden die Alignments mit Hilfe des Programms Jalview manuell ausgewertet.

## **2.3 Generierung von HCMV-Mutanten mit definierten Punktmutationen mittels en-passant Mutagenese**

### **2.3.1 Generierung von PCR-Produkten mit definierter Punktmutation, I-Sce-I-Schnittstelle und positivem Selektionsmarker**

Zur Generierung von HCMV-Mutanten mit definierten Punktmutationen ist die Amplifikation eines, die gewünschte Mutation enthaltendes, PCR-Produktes notwendig. Als Vorlage für die Generierung des PCR-Produktes diente das Plasmid pEP-kanS. (Tischer et al.; 2006) Dieses verfügt neben einem Kanamycin-Resistenz-Gen, welches als positiver Selektionsmarker dient, zusätzlich über eine Erkennungsstelle der Endonuklease I-Sce-I. Das finale PCR-Produkt besteht aus einem positiven Selektionsmarker und einer Erkennungsstelle für I-Sce-I, welche von homologen HCMV-Sequenzen (30-50bp) flankiert werden und die gewünschte Punktmutation enthalten. Diese homologen HCMV-Sequenzen ermöglichen die Integration des PCR-Produktes in die entsprechende Region von UL27 oder UL44 des BAC-Genoms. Durch die Spaltung durch I-Sce-I nach Integration des PCR-Produktes in das BAC-Genom kommt es zur Linearisierung des BACs. Anschließend erfolgt ein zweiter Rekombinationsschritt zwischen beiden homologen HCMV-Sequenzen, welcher zur Entfernung des Kanamycin-Resistenz-Gens und zur anschließenden Ringbildung des BACs führt.

Es wurden Primer für die Einbringung der UL27-Mutationen A20D, A184V, A558D und InsT28, sowie für die Einbringung der UL44-Mutationen InsA12, InsC8, InsT23 und R6G generiert. Ein Primerpaar ermöglichte die Kombination der beiden Mutationen R6G und InsT23.

Mittels zweier aufeinander folgender PCR-Reaktionen wurde das PCR-Produkt

generiert. Das Plasmid pEP-kanS wurde hierbei in einer Konzentration von 1 ng/ $\mu$ l verwendet. Diese niedrige Konzentration ist notwendig um im Anschluss an die PCR jegliche Residuen des Vorlage-Plasmids mittels DpnI-Verdau zu entfernen. In der ersten PCR wurde nur ein forward Primer mit homologen HCMV-Sequenzen verwendet. Das 5'-Ende bestand aus einer homologen HCMV-Sequenz von 61 bp, welche die gewünschte Mutation enthielt. Über das 3'-Ende wurde die Bindung an das Plasmid pEP-kanS ermöglicht, da es eine komplementäre Sequenz zur I-Sce-I Erkennungsstelle und eines Abschnittes des Kanamycin-Resistenz-Gens enthielt. Als reverse Primer diente eine 21 bp lange Sequenz, über welche die Bindung an pEP-kanS ermöglicht wurde.

Die Mutagenese-PCR wurde mit dem PCR Master Mix Pwo Master der Firma Roche durchgeführt:

Primer forward	1 $\mu$ l
Primer reverse	1 $\mu$ l
pEP-kanS (1:400 in ddH <sub>2</sub> O)	1 $\mu$ l
Pwo Master	50 $\mu$ l
ad ddH <sub>2</sub> O	47 $\mu$ l
<hr/>	
$\Sigma$	100 $\mu$ l

Die Amplifikation erfolgte mit folgendem Programm:

Initiale Denaturierung	95°C	5 min
9 Zyklen:		
Denaturierung	95°C	45 s
Annealing	51°C	2 min
Elongation	68°C	2 min
<hr/>		
24 Zyklen:		
Denaturierung	95°C	45 s
Annealing	60°C	2 min
Elongation	68°C	2 min
Terminale Elongation	68°C	10 min

Mittels einer zweiten PCR wurden die homologen HCMV-Sequenzen am 3'-Ende hinzugefügt. Das Produkt der ersten PCR wurde mit dem Kit NucleoSpin Extract II von Macherey-Nagel gereinigt und in 50 µl ddH<sub>2</sub>O eluiert. 1 µl der ersten PCR-Produktes wurde für die zweite PCR verwendet.

Dieses Mal enthielt der reverse Primer am 5'-Ende eine homologe HCMV-Sequenz von 62 bp Länge, welche die gewünschte Punktmutation enthielt. Das 3'-Ende war komplementär zur I-Sce-I Erkennungsstelle und eines Abschnittes des Kanamycin-Resistenz-Gens von pEP-kanS. Der forward Primer war komplementär zu einem kurzen Abschnitt der homologen HCMV-Sequenz am 5'-Ende des Templates und hatte eine Länge von 21 bp.

Die zweite Mutagenese PCR wurde ebenfalls mit dem PCR Master Mix Pwo Master der Firma Roche durchgeführt. Zur Amplifikation wurde dasselbe Programm wie für die erste PCR genutzt.

Primer forward	1 µl
Primer reverse	1 µl
PCR-Produkt der 1. PCR	1 µl
Pwo Master	50 µl
ad ddH <sub>2</sub> O	47 µl
<hr/>	
Σ	100 µl

Alle PCR-Produkte wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Zur Kontrolle des Erfolges der PCR wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt, wie in Abschnitt 2.2.3 auf S.33 beschrieben.

### 2.3.2 Aufreinigung des PCR-Produktes mittels DpnI-Verdau

Nach Durchführung der beiden PCRs müssen überschüssige Vorlage-Plasmide entfernt werden. Diesem Schritt kommt eine besondere Bedeutung zu, da das Kanamycin-Resistenz-Gen als positiver Selektionsmarker für die erfolgreich transformierten Bakterien dienen soll. Ohne die Entfernung von residualem pEP-kanS wäre eine Unterscheidung von Bakterien, die pEP-kanS oder das PCR-Produkt mit der gewünschten Mutation aufgenommen hatten, nicht möglich.

Vor dem Verdau wurden alle PCR-Produkte gereinigt, damit es zu keinen Interferenzen

zwischen PCR-Puffer und DpnI-Aktivität kam. Die Aufreinigung erfolgte mit dem Kit NucleoSpin Extract II der Firma Macherey-Nagel und die PCR-Produkte wurden in 50  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

Die Entfernung erfolgte mittels DpnI-Verdau. Da DpnI nur methylierte DNA schneidet, wird nur DNA, welche nicht mittels PCR amplifiziert wurde, gespalten. So konnte pEP-kanS entfernt werden, ohne dass das PCR-Produkt betroffen war.

Der DpnI-Verdau erfolgte mit folgendem Ansatz über einen Zeitraum von 2 h bei 37°C im PCR-Cycler:

PCR-Produkt	50 $\mu\text{l}$
10x Puffer 4 (NEB)	9 $\mu\text{l}$
DpnI	3 $\mu\text{l}$
ad ddH <sub>2</sub> O	8 $\mu\text{l}$
<hr/>	
$\Sigma$	70 $\mu\text{l}$

Im Anschluss an den Verdau erfolgte ein weiterer Aufreinigungsschritt mit dem Kit NucleoSpin Extract II der Firma Macherey-Nagel. Die DNA wurde in 15  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

### **2.3.3 Herstellung elektrokompetenter *E.coli* Bakterien mit HCMV-BAC-DNA und Elektroporation**

10 ml LB-Medium mit 25  $\mu\text{l}$  Chloramphenicol Stammlösung wurde mit dem *E.coli* Stamm GS1783/TB40-BAC<sub>KL7</sub>-UL32EGFP beimpft und bei 160 rpm bei 32°C über Nacht im Schüttler inkubiert. Am folgenden Morgen wurde ein Erlenmeyerkolben mit 50 ml LB-Medium und 125  $\mu\text{l}$  Chloramphenicol befüllt und 1 ml der Übernachtskultur hinzugegeben. Die Ansätze wurden für 2,5 h bei 160 rpm und 32°C inkubiert. PCR-Produkte, Pipetten, Elektroporationküvetten, Falcons und autoklaviertes Wasser wurden vorgekühlt.

Im Anschluss erfolgte die Inkubation für genau 15 min bei 42°C im Wasserbad-Schüttler. Dadurch wurde die Expression der Rekombinase-Gene des  $\alpha$ -Prophagen, welcher in das Genom von GS1783 eingebracht war, induziert. Die Bakterien wurden in ein vorgekühltes 50 ml Falcon überführt und für 1 h auf Eis inkubiert.

Nun erfolgte eine Zentrifugation bei 5000 x g und 4°C für 5 min. Der Überstand wurde

verworfen und das Pellet in 10 ml eiskaltem Wasser durch Schütteln im Eiswasserbad resuspendiert. 40 ml eiskaltes Wasser wurden hinzugegeben und es folgte eine weitere Zentrifugation bei 7000 x g und 4°C für 10 min. Dieser Waschschrift wurde zwei weitere Male wiederholt und nach dem letzten wurde der Überstand verworfen und das Pellet im Rückfluss resuspendiert.

100 µl der Bakteriensuspension und 5 µl des PCR-Produktes mit der gewünschten Punktmutation wurden in eine vorgekühlte 2 mm Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 2500 V und 15 µF. Direkt darauf wurden die Bakterien mit 1 ml LB-Medium versetzt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es erfolgte die Inkubation bei 160 rpm und 32°C für 2 h. Während dieser Zeit erfolgt die Expression der Antibiotika-Resistenz-Gene und das Wachstum der erfolgreich transformierten Bakterien auf Kanamycin- und Chloramphenicol-haltigen Medien wurde ermöglicht. Im Anschluss erfolgte die Zentrifugation bei 6000 x g für 30 s und 800 µl des Überstandes wurden verworfen. Nach Resuspendierung des Pellets in den restlichen 200 µl des Überstandes wurden die Bakterien auf 2 LB-Agarplatten ausplattiert. Diese enthielten je 50 µg/ml Kanamycin und 25 µg/ml Chloramphenicol. Die Inkubation erfolgte bei 32°C über Nacht.

PCR-Produkte, welche zwar in Bakterien elektroporiert wurden, es aber zu keiner Integration in das Genom kam, werden in der Bakterienzelle abgebaut und die Ausbildung einer Kanamycinresistenz bleibt aus. Somit wurde sichergestellt, dass nur Bakterien, bei denen die Rekombination in das BAC erfolgreich verlief, auf den Agarplatten wachsen konnten.

### **2.3.4 Entfernung des positiven Selektionsmarkers aus der HCMV-BAC-DNA in E.coli mittels Red-Rekombinase-Protokoll**

Zur Entfernung der Kanamycin-Resistenz wurden von jeder Mutante je zwei Klone in einer Übernachtkultur aus 1 ml LB-Medium mit 2,5 µl Chloramphenicol-Stammlösung bei 32°C angesetzt.

Von jeder Übernachtkultur wurden 100 µl in 2 ml LB-Medium überführt und für 2 h bei 32°C und 160 rpm im Schüttler inkubiert. Im Anschluss wurden 2 ml LB-Medium mit 1 % Arabinose hinzugegeben und die Ansätze wurden erneut bei 32°C und 16

rpm für 30 min im Schüttler inkubiert.

Durch die Zugabe von Arabinose wird die Expression von I-Sce-I induziert, da das, im Genom von *E. coli* GS1783 enthaltende, kodierende Gen unter der Kontrolle eines Arabinose-induzierbaren Promotors steht. Das Enzym bindet und schneidet innerhalb der I-Sce-I-Erkennungssequenz des integrierten PCR-Produktes und führt damit zur Linearisierung des BACs. Die Erkennungssequenz von I-Sce-I findet sich nur sehr selten in Genomsequenzen. Weder TB40-BAC<sub>KL7</sub>-UL32EGFP noch *E. coli* GS1783 besitzen diese Sequenz und sind somit nicht von der Endonukleaseaktivität betroffen. Somit wird nur das rekombinierte TB40-BAC<sub>KL7</sub>-UL32EGFP mit dem PCR-Produkt linearisiert.

Über homologe Rekombination der zwei, den positiven Selektionsmarker flankierenden, HCMV-Sequenzen kommt es zum Ringschluss des BACs. Dies führt zur Entfernung des positiven Selektionsmarkers und somit ist die gewünschte Punktmutation die einzige Modifikation des BAC-Genoms. Diese zweite Rekombination wurde durch die Inkubation der Bakterien für genau 15 min bei 42°C im Wasserbadschüttler induziert und beruht auf der Induktion der Gen-Expression der Rekombinase-Gene des  $\alpha$ -Prophagen durch Wärme. Die Bakterien wurde im Anschluss für 2 h bei 32°C und 160 rpm im Schüttler inkubiert. Im Anschluss wurde jeder der Ansätze 1:10000 verdünnt und je 100  $\mu$ l der Verdünnung auf LB-Agarplatten mit 25  $\mu$ g/ml Chloramphenicol und 1 % Arabinose ausplattiert. Die Platten wurde am Versuchstag frisch gegossen. Daraufhin erfolgte die Inkubation bei 32°C über Nacht.

Nun erfolgte ein weiterer Selektionsschritt. Die verwendeten Agarplatten beinhalteten nur Chloramphenicol, weswegen nicht zwischen Kulturen mit erfolgreicher Entfernung des positiven Selektionsmarkers und solchen, bei denen dies nicht der Fall war, unterschieden werden konnte. Um dies zu erreichen, wurden am Folgetag einzelne Kolonien von den Agarplatten abgenommen und in 20  $\mu$ l LB-Medium resuspendiert. Nun wurde je 1  $\mu$ l der Suspension auf eine LB-Agarplatte mit nur Chloramphenicol und eine LB-Agarplatte mit Chloramphenicol und Kanamycin aufgetropft. Beide Agarplatten wurden bei 32°C über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurde das Bakterienwachstum auf beiden Platten miteinander verglichen. Bei erfolgreicher Entfernung des positiven Selektionsmarkers waren die Bakterien nur in der Lage auf der Chloramphenicol-haltigen LB-Agarplatte zu

wachsen, nicht aber auf der LB-Agarplatte, welche sowohl Chloramphenicol als auch Kanamycin enthielt.

### **2.3.5 Kontrolle der Mutagenese durch Isolierung der rekombinanten HCMV-BAC-DNA mittels Minipräparation und anschließender Sequenzanalyse**

Die erfolgreiche Mutagenese wurde durch Isolierung der BAC-DNA mit anschließender Sequenzierung überprüft. Die BAC-DNA wurde mit Hilfe des Kits NucleoSpin Plasmid der Firma Macherey-Nagel in Kombination mit einer Phenol/Chloroform-Extraktion zur Verbesserung der Ausbeute und Reinheit der DNA isoliert. Danach schloss sich die Sequenzierung des Gens UL27 bzw. UL44 zur Kontrolle der erfolgreichen Mutation an.

Hierfür wurden 10 ml LB-Medium mit 25 µg/ml Chloramphenicol mit einer Kanamycinsensitiven Kolonie beimpft und bei 32°C und 160 rpm über Nacht im Schüttler inkubiert. Am Folgetag erfolgte die Zentrifugation bei 2860 x g und 4°C für 15 min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 250 µl Resuspensionspuffer des Kits NucleoSpin Plasmid der Firma Macherey-Nagel resuspendiert. Nach der Überführung in ein 2 ml Reaktionsgefäß und der Zugabe von 250 µl Lysepuffer erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min. In dieser Zeit erfolgte die alkalische Lyse der Bakterien und die Denaturierung von Proteinen. Das Stoppen der Reaktion erfolgte durch die Zugabe von 250 µl Neutralisationspuffer. Nach einer Inkubation auf Eis für 10 min folgte die Zentrifugation bei 20000 x g für 10 min. Nach Überführung des Überstandes in ein 2 ml Phase Lock Gel Heavy-Gefäß und der Zugabe von 750 µl Phenol/Chloroform wurde der Ansatz durch mehrmalige Invertierung des Gefäßes gemischt. Im Anschluss folgte eine erneute Zentrifugation bei 20000 x g für 5 min, während der das Phase Lock Gel zwischen die wässrige und organische Phase des Ansatzes wandert und zu einer Trennung der beiden führt. Da sich nach der Zentrifugation die DNA in der wässrigen Phase im oberen Abschnittes des Gefäßes befindet, lässt sich diese leicht abnehmen und in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführen. Die DNA wurde durch die Zugabe von 1 ml Isopropanol gefällt. Danach erfolgte die Zentrifugation bei 20000 x g und 4°C für 20 min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 70%-igem Ethanol gewaschen. Nach

Zentrifugation bei 20000 x g und Raumtemperatur für 10 min wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet in 50 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

Im Vorfeld der Sequenzierung erfolgte eine PCR zur Amplifizierung der Genregion von UL27 bzw. UL44. Dabei wurde wie in Abschnitt 2.2.2 auf S.33 beschrieben, verfahren. Zur Erfolgskontrolle wurde wie in Abschnitt 2.2.3 auf S.33 verfahren. Die Sequenzierung erfolgte, wie in Abschnitt 2.2.4 auf S.34 beschrieben.

### **2.3.6 Isolierung der rekombinanten HCMV-BAC-DNA mittels Midipräparation**

Nach Bestätigung der erfolgreichen Mutagenese des HCMV BAC-Genoms durch Sequenzierung wurde mittels Midipräparation größere Mengen BAC-DNA aus Bakterien zur Transfektion gewonnen.

200 ml LB-Medium mit 25 µg/ml Chloramphenicol wurden mit der entsprechenden Bakterienkolonie beimpft und bei 32°C und 160 rpm über Nacht im Schüttler inkubiert. Von der Übernachtskultur wurde 1 ml abgenommen und bei -80°C eingefroren. Die Midipräparation erfolgte mit den restlichen 199 ml mit dem Kit Nucleobond Xtra Midi der Firma Macherey-Nagel. Die Übernachtskultur wurde bei 2860 x g und 4°C für 15 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 14 ml Resuspensionspuffer resuspendiert und durch die Bakterien wurden durch die Zugabe von 14 ml Lysepuffer aufgeschlossen. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch die Zugabe von 14 ml Neutralisationspuffer gestoppt. Der Ansatz wurde vorsichtig auf den Rand des Nucleobond Xtra Filters aufgetragen. Die Reinigung des Lysats ist erforderlich, da sonst die Säule verstopfen würde. Filter und Säule wurden mit 5 ml Equilibrierungspuffer gewaschen und der Filter wurde verworfen. Nun wurde die Säule mit 8 ml Waschpuffer gewaschen. Mittels 5 ml Elutionspuffer wurde die DNA gelöst und in ein 14 ml Polypropylen-Röhrchen überführt. Zum Ausfällen wurden 3,5 ml Isopropanol hinzugegeben und es folgte die Zentrifugation bei 12000 x g und 4°C für 30 min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 70%-igem Ethanol gewaschen. Anschließend folgte eine weitere Zentrifugation bei 12000 x g und Raumtemperatur für 5 min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet nach dem Trocknen in

100 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst und bei 4°C gelagert. Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde 1 µl des Ansatzes mit 99 µl ddH<sub>2</sub>O verdünnt und die Konzentration bei 260 nm mit dem Photometer gemessen.

## **2.4 Anzucht von rekombinanten HCMV-Mutanten in Zellkultur**

### **2.4.1 Zellkultur für humane Vorhautfibroblasten und humane retinale Pigmentzellen**

HFF wurden bei -80°C in 2 ml Kryotubes gelagert. Für die Zellkultur wurde ein Kryotube bei Raumtemperatur aufgetaut und in ein 15 ml Falcon, welches 8 ml Minimal Essential Medium (MEM) + 5% fetales Kälberserum (FCS) + 1% Penicillin/Streptomycin (P/S) enthielt, überführt. Es erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 1700 x g für 5 Minuten. Der Überstand wurde verworfen. Mit 6 ml MEM + 5% FCS + 1% P/S wurde das Pellet aufgelöst und auf einer 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche ausgesät. Es erfolgte die Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> bis sich ein konfluenter, einschichtiger Zellrasen gebildet hatte. Dies erfolgte zumeist über einen Zeitraum von einer Woche. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und für 5 Minuten bei 37°C mit 2 ml Trypsin inkubiert, damit sich der Zellrasen vom Boden der Zellkulturflasche löste. Durch das Hinzugeben von 2 ml MEM + 5% FCS + 1% P/S wurde die Reaktion gestoppt und die Suspension wurde auf ein 50 ml Falcon überführt. Es erfolgte die Zentrifugation bei 1700 x g für 5 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 9 ml MEM + 5% FCS + 1% P/S aufgelöst und auf einer 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche ausgesät. Sobald sich ein konfluenter, einschichtiger Zellrasen gebildet hatte wurden die HFF, wie schon beschrieben, auf eine 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt. In der Zellkultur wurden HFF auf 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen in MEM + 5% FCS + 1% P/S gehalten und bei Konfluenz des einschichtigen Zellrasens im Verhältnis 1:2 gesplittet.

Bei der Zellkultur mit humanen retinalen Pigmentepithelzellen (ARPE-19) wurde DMEM-F12 + 5% FCS + 1% P/S als Medium verwendet, sonst wurde genau wie bei HFF verfahren.

## 2.4.2 Transfektion der rekombinanten HCMV-BAC-DNA in HFF

Die Transfektion der BAC-DNA in HFF wurde in 6-well Mikrokulturplatten mittels einer modifizierten  $\text{Ca}_2\text{PO}_4$ -Methode mit dem Kit Mammalian Transfection Kit der Firma Stratagene durchgeführt. Für jede Mutation wurde ein stets getrennter Doppelansatz durchgeführt.

Am Vortag der Transfektion wurde 6-well Mikrokulturplatten mit  $3 \times 10^5$  Zellen/well HFF ausgesät. 5  $\mu\text{l}$  Hering-Sperma-DNA (5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) und 1  $\mu\text{g}$  BAC-DNA wurden für jeden Ansatz in ein 3,5 ml Sarstedt-Röhrchen gegeben und mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  auf ein Gesamtvolumen von 75  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Zur Schonung der BAC-DNA wurde stets mit geschnittenen Pipettenspitzen gearbeitet. 8,3  $\mu\text{l}$  Solution 1 wurde in jedes Sarstedt-Röhrchen gegeben und der Ansatz wurde durch vorsichtiges Beklopfen gemischt. Nun wurde tröpfchenweise 83,3  $\mu\text{l}$  Solution 2 hinzugegeben und für genau 25 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde das MBS-Medium durch Versetzen von MEM mit 6 % Solution 3 vorbereitet. Nach der Inkubation wurde die Reaktion durch die Zugabe von 430  $\mu\text{l}$  MBS-Medium gestoppt. Zu transfizierende HFF wurden einmal mit PBS gewaschen und der Ansatz aus den Sarstedt-Röhrchen wurde vorsichtig auf die Zellen getropft. Nach einer Inkubationsperiode von genau 2 h bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  wurde die DNA-Lösung abgenommen und 1 ml eisgekühlte Glycerol-Schock-Solution hinzugegeben. 3 ml MEM wurde nach genau 30 s zur Verdünnung hinzugegeben und die gesamte Lösung abgenommen. Nach zwei weiteren Waschschritten mit MEM wurde 3 ml MEM + 5 % FCS + 1 % P/S hinzugegeben und bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  im Brutschrank für 2 d inkubiert. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit wurden die Ansätze je Mutante gepoolt und auf eine 25  $\text{cm}^2$  Zellkulturflasche übertragen. Alle 5 Tage wurden die Zellen auf eine neue Zellkulturflasche übertragen um das Viruswachstum zu unterstützen und nach gewöhnlich 1-3 Wochen nach Transfektion ließ sich beginnende Plaqueformierung beobachten. Sobald sich ein CPE von 90% zeigte, wurden nicht infizierte HFF mit 1 ml des Überstandes beimpft und restlicher Überstand mit enthaltendem, infektiösem Virus wurde aliquotiert und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Viruspassagierung erfolgte für gewöhnlich bis Passage 3.

Mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit der Firma Qiagen wurde virale DNA aus 200  $\mu\text{l}$  des Überstandes isoliert, mittels PCR amplifiziert und anschließend, wie in Abschnitt 2.2.4 auf S.34 beschrieben, sequenziert. So konnte die Präsenz der

gewünschten Mutation nachgewiesen werden.

## 2.5 Phänotypische Charakterisierung

### 2.5.1 Bestimmung der Multiplicity of Infection und Tissue Culture Infectious Dose 50

Bestimmung der Multiplicity of Infection (MOI) und der Tissue Culture Infectious Dose 50 (TCID<sub>50</sub>) erfolgte als Endverdünnungsassay. (Mahy and Kangro; 1996) Zur Durchführung wurde eine 96-well Mikrokulturplatte mit  $2 * 10^4$  HFF pro well ausgesät und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> über Nacht im Brutschrank inkubiert. So wurde die Adhäsion der Zellen am Plattenboden sichergestellt. Am Folgetag wurde ein Aliquot mit Virusüberstand bei Raumtemperatur aufgetaut und es wurde eine Verdünnungsreihe von  $10^{-1}$  bis  $10^{-6}$  angelegt und auf die 96-well Mikrokulturplatte wie in Abbildung 2.1 auf S.46 dargestellt, aufgetragen. Jede Verdünnungsstufe wurde in einem Vierfachansatz untersucht. Nach einer Inkubationsperiode von 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank wurde der Überstand verworfen und die Ansätze mit 80%-igem Aceton für 5 min bei Raumtemperatur fixiert. Es folgten drei Waschschrte mit PBS.

Die Infektion wurde durch Immunfluoreszenzfärbung von HCMV immediate early (IE) Proteinen nachgewiesen. PBS wurde verworfen und 100 µl Primärantikörper anti-p72 (1:1000 in PBS) je well wurde hinzugegeben und für 2 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurde der Primärantikörper verworfen und es folgten 3 Waschschrte mit PBS. Je well wurden 100 µl Sekundärantikörper Cy3-labeled Ziege-Anti-Maus (1:300 in PBS) hinzugegeben und für 2 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Im Anschluss wurde der Sekundärantikörper verworfen und es folgten 3 Waschschrte mit PBS. Nach dem letzten Waschschrte wurden 200 µl PBS je well hinzugegeben.

Mittels Axiovert200 Immunfluoreszenzmikroskop erfolgte die Auswertung. Jedes well wurde auf IE-positive Zellen untersucht. Bei Nachweis mindestens einer positiven Zelle wurde das well als positiv deklariert und alle positive Zellen der letzten positiven Verdünnungsstufe wurden ausgezählt.

Die MOI ist als das Verhältnis zwischen infektiösen Viruspartikeln zu Zielzellen

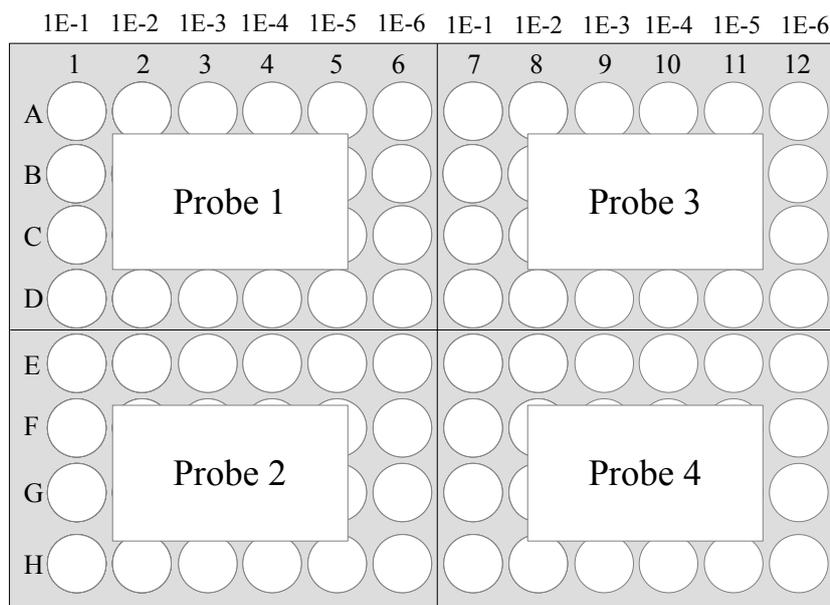


Abbildung 2.1: **Pipetierschema für die TCID<sub>50</sub>-Bestimmung:** Mit einer Virusverdünnungsreihe wurden HFF auf einer 96-well Mikrokulturplatte nach dem gezeigten Schema infiziert. Jede Verdünnungsstufe wurde im Vierfachansatz untersucht.

definiert. Zur MOI-Bestimmung wurden alle IE-positiven Zellen aller wells der höchsten Verdünnungsstufe ausgezählt, in der noch in mindestens einem well eine IE-positive Zelle nachgewiesen werden konnte. Folgende Formel wurde verwendet:

$$\frac{\text{Anzahl infizierter Zellen} * \text{Verdünnungsstufe}}{\text{Zahl der Zielzellen pro well}}$$

Die TCID<sub>50</sub> ist die Virusverdünnung, bei der 50 % der Zellen infiziert sind. Zur Bestimmung wurde die Formel nach Spearman und Kärber verwendet:

$$\log \text{TCID}_{50} = m = x^a - (\text{Sq} - 0,5)$$

Die letzte Verdünnungsstufe, in der noch in allen wells eines Ansatzes IE-positive Zellen nachgewiesen werden konnten, ist  $x^a$ . Die Summe der Quotienten der Verdünnungsstufe bei der noch in allen wells IE-positive Zellen vorhanden waren und der Verdünnungsstufe bei der kein well mehr IE-positive Zellen aufwies ist Sq. Die TCID<sub>50</sub> entspricht einem Virustiter von  $10^m$ . Die TCID<sub>50</sub> bezieht sich auf ein Volumen von 100 µl, da dies das eingesetzte Volumen der Verdünnungsstufen war. Somit ergibt sich:

$$\frac{\text{TCID}_{50}}{100 \text{ } \mu\text{l}} * 10 = \frac{\text{TCID}_{50}}{\text{ml}}$$

## 2.5.2 Bestimmung der Wachstumskinetik durch Wachstumsversuche

Um die Wachstumskinetik der generierten Mutanten zu beurteilen, wurde diese mit der Referenz HCMV-TB40-BAC<sub>KL7</sub>-UL32EGFP verglichen. Da das von TB40/E abstammende BAC HCMV-TB40-BAC<sub>KL7</sub>-UL32EGFP ein an Zellkultur adaptierter Laborstamm ist, werden Nachkommenviren in den Überstand abgegeben. Dies gilt auch für die in dieser Arbeit generierten Mutanten. Somit konnten die Wachstumsversuche rein mit Virusüberständen durchgeführt werden.

Für den Assay wurden  $2 \times 10^5$  HFF/well auf 6-well Mikrokulturplatten ausgesät und diese bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 24 h inkubiert. Am Folgetag wurden 8 wells mit rekombinantem Virus mit einer MOI von 1 infiziert. Je well wurde 1 ml des Virusüberstandes hinzugegeben und 1 ml desselben wurde aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Nach einer Inkubationszeit von 4 h wurde der Überstand abgenommen und mit frischem MEM + 5 % FCS + 1 % P/S ersetzt. Für 8 aufeinander folgende Tage wurde täglich der Überstand eines wells aliquotiert und bei -80° eingefroren. Die Wachstumskurven wurde durch das Auftragen der  $\log(\text{TCID}_{50}/\text{ml})$  gegen die Zeit für jeden Virusstamm generiert.

## 2.5.3 Bestimmung der IC<sub>50</sub> mittels Plaque-Reduktions-Assays

Mittels Plaque-Reduktions-Assay (PRA) wurde beurteilt, ob die generierten Mutanten eine Resistenz gegen GCV, CDV oder PFA besaßen.

Eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche mit einer konfluenten HFF-Monoschicht wurde mit Virus beimpft und bei 37° und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert, bis sich ein CPE von 80-90 % nachweisen ließ. Die Zellen wurden mittels Trypsin gelöst und nach einer Zählung mittels Neubauer Zählkammer auf  $5 \times 10^4$  Zellen/ml eingestellt. Von diesem Ansatz ausgehend wurde eine Verdünnungsreihe von 5000 Zellen/ml, 2500 Zellen/ml und 1500 Zellen/ml angesetzt. Es wurden ARPE-19 mittels Trypsin aus einer 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche gelöst, mittels Neubauer Zählkammer gezählt und auf  $2 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt. Zu jeder Verdünnungsstufe mit infizierten HFF wurden Volumenverhältnis von 1:1 ARPE-19 hinzugegeben. Für den Assay wurden 96 well Mikrokulturplatten verwendet. 100 µl dieser Suspension wurden pro well ausgesät.

Pro Verdünnungsstufe erfolgte ein Vierfachansatz.

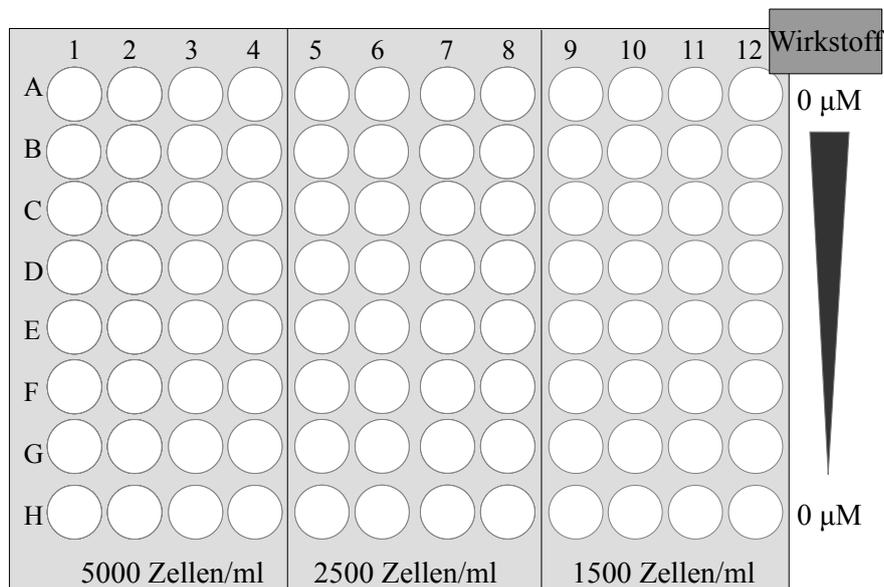


Abbildung 2.2: **Pipetierschema für den PRA-Ansatz:** Drei Verdünnungsstufen von infizierten HFF wurden nicht-infizierte ARPE-19 beigefügt und in einem Vierfachansatz auf einer 96-well Mikrokulturplatte ausgesät. Die erste und letzte Reihe dienen als Negativkontrolle.

Direkt im Anschluss wurden Verdünnungsstufen von GCV, CDV oder PFA hinzugegeben. Zu je 100  $\mu\text{l}$  Zellsuspension je well wurden 100  $\mu\text{l}$  der Wirkstoff-Verdünnungsstufe hinzugegeben. Abbildung 2.2 auf S. 48 zeigt das Pipetierschema.

Aus der folgenden Verdünnungsreihe ergab sich so die hervorgehobene Endkonzentration im Assay:

GCV	100 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	20 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$
<i>GCV</i>	<i>50 <math>\mu\text{M}</math></i>	<i>25 <math>\mu\text{M}</math></i>	<i>10 <math>\mu\text{M}</math></i>	<i>5 <math>\mu\text{M}</math></i>	<i>2,5 <math>\mu\text{M}</math></i>	<i>0,5 <math>\mu\text{M}</math></i>
CDV	20 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	2 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	0,4 $\mu\text{M}$	0,2 $\mu\text{M}$
<i>CDV</i>	<i>10 <math>\mu\text{M}</math></i>	<i>5 <math>\mu\text{M}</math></i>	<i>1 <math>\mu\text{M}</math></i>	<i>0,5 <math>\mu\text{M}</math></i>	<i>0,2 <math>\mu\text{M}</math></i>	<i>0,1 <math>\mu\text{M}</math></i>
PFA	1000 $\mu\text{M}$	800 $\mu\text{M}$	600 $\mu\text{M}$	400 $\mu\text{M}$	200 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
<i>PFA</i>	<i>500 <math>\mu\text{M}</math></i>	<i>400 <math>\mu\text{M}</math></i>	<i>300 <math>\mu\text{M}</math></i>	<i>200 <math>\mu\text{M}</math></i>	<i>100 <math>\mu\text{M}</math></i>	<i>50 <math>\mu\text{M}</math></i>

Jede 96-well Mikrokulturplatte wurde bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> für 7 d inkubiert. Dann wurde der Überstand verworfen und die Zellen mit 80%-igem Aceton fixiert. Die Färbung zur Auswertung erfolgte wie in Abschnitt 2.5.1 auf S.45 beschrieben, nur dass als Primärantikörper HCMV anti-pp65 (monoklonal IgG-Maus, 1:250 in PBS) verwendet wurde. Die Auswertung erfolgte mittels Axiovert200 Immunfluoreszenzmikroskop durch manuelle Zählung der formierten Plaques der Verdünnungsstufe. Als Plaque wurde eine Ansammlung von mindestens 5 benachbarten, infizierten Zellen definiert.

Die Ermittlung der IC<sub>50</sub> erfolgte mittels SPSS Probit Analyse. Die IC<sub>50</sub> ist die Konzentration eines Wirkstoffes bei der *in vitro* das virale Wachstum um 50% zurückgeht. Um zu bestimmen, ob eine Resistenz der untersuchten HCMV-Mutante vorlag, wurde die IC<sub>50</sub> derselben mit der IC<sub>50</sub> des sensiblen Referenzstamms HCMV-TB40-BAC<sub>KL7</sub>-UL32EGFP verglichen. Eine Ratio von  $\geq 2$  wird als Resistenz definiert. (Lurain and Chou; 2010)

# 3 Ergebnisse

## 3.1 Analyse der HCMV-Isolate

### 3.1.1 Extraktion, Amplifikation und Analyse der HCMV-Gene UL27 und UL44

Für 12 HCMV-Isolate, die phänotypisch eine GCV-Resistenz zeigten, ohne dass bekannte korrespondierende Mutationen in UL97 oder UL54 vorlagen, sollten die viralen Gene UL27 und UL44 sequenziert werden und die gefundenen Mutationen anschließend mittels Marker Transfer Analyse charakterisiert werden. Um Mutationen in den HCMV-Stämmen, mit denen die Patienten infiziert waren, zu identifizieren, muss diese als erstes aus den Isolaten extrahiert werden. Dies erfolgte bei allen 12 Patientenproben mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit der Firma Qiagen aus 200 µl, wie in Abschnitt 2.2.1 auf S.32 beschrieben. Um genug DNA für die Sequenzierung zu gewinnen, musste die virale HCMV-DNA amplifiziert werden. Dafür wurden für alle Proben PCRs mit Primern für die viralen Gene UL27 und UL44, wie in Abschnitt 2.2.2 auf S.33 beschrieben, durchgeführt. Für jedes Gen wurden 3 Primerpaare aus jeweils einem *forward*- und einem *reverse*-Primer verwendet. Somit wurde die Sequenz jedes Gens in drei Abschnitte unterteilt. Der Erfolg der PCR wurde, wie in Abschnitt 2.2.3 auf S.33 beschrieben, mittels Gelelektrophorese überprüft (siehe Abbildung 3.1 auf S.51 und Abbildung 3.2 auf S.51). Dies erfolgte bei allen HCMV-Isolaten für die viralen Gene UL27 und UL44.

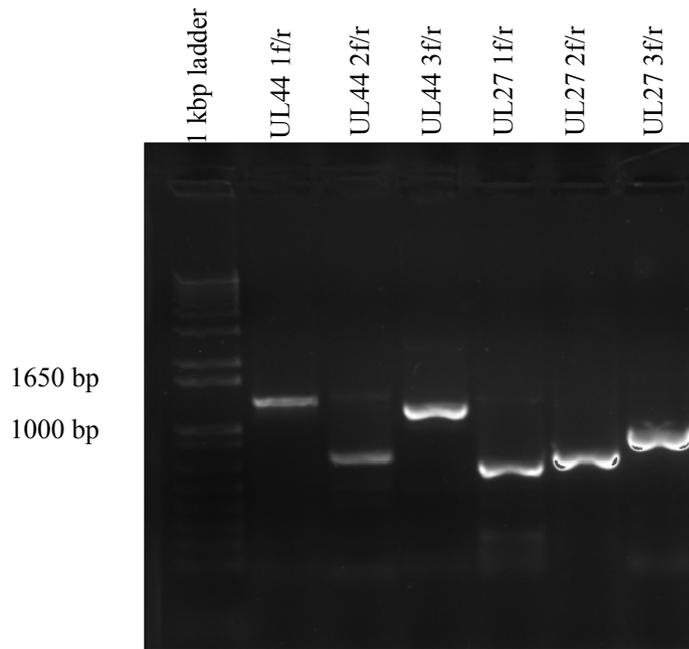


Abbildung 3.1: **PCR für Sequenzierung für P6:** Die PCR-Produkte wurden auf ein 1 %iges Agarosegel geladen und bei 90 V separiert.

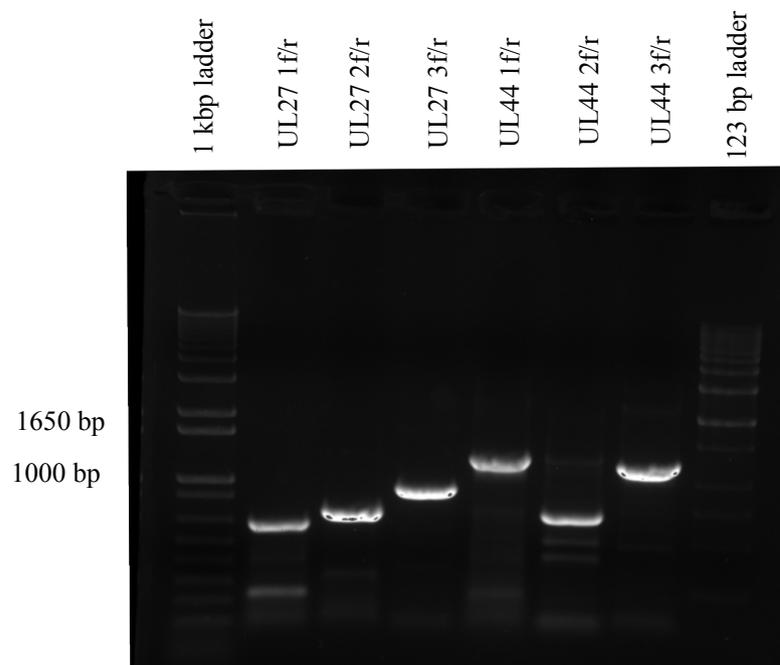


Abbildung 3.2: **PCR für Sequenzierung für P9:** Die PCR-Produkte wurden auf ein 1 %iges Agarosegel geladen und bei 90 V separiert.

### **3.1.2 Identifikation von putativ Resistenz-assoziierten Mutationen in den HCMV-Genen UL27 und UL44 aus gereinigten HCMV-DNA**

Die Sequenzierung der Isolate erfolgte durch die Firma GATC Biotech, Konstanz, wie in Abschnitt 2.2.4 auf S.34 beschrieben. Dies erfolgte für die viralen Gene UL27 und UL44 für alle 12 Isolate. Die so aus den HCMV-Isolaten gewonnenen Sequenzen wurden, wie in Abschnitt 2.2.5 auf S.34 beschrieben, mit den Sequenzen von UL27 und UL44 der Laborstämme AD169, MERLIN und TB40/E mittels Multiple Sequence Alignment mit dem Programm ClustalOmega verglichen. Basenaustausche, welche durch Veränderung des Codons zu einer veränderten Aminosäure-Sequenz führten, wurden manuell mit dem Programm Jalview herausgesucht. Für das virale Gen UL27 wurden 11 Mutationen und für UL44 wurden 4 Mutationen identifiziert. Für UL27 zeigten sich die Mutationen Q14K, A20D, L133I, S173I, A184V, V310A, A558D, InsT28, DelG1564 und DelT1589 (Abbildung 3.4 auf S.54). Für UL44 zeigten sich die Mutationen InsC8, InsA12, InsT23 und die Kombination R6G/InsT23 (Abbildung 3.3 auf S.53). Jede Insertion wurde in zwei verschiedenen Patientenproben gefunden. Zur weiteren Charakterisierung mittels Marker Transfer Analyse wurden die UL27 Mutationen InsT28, A20D, A184V, A558D und die UL44 Mutationen InsC8, InsA12, R6G, InsT23 und R6G/InsT23 ausgesucht. Dies bedeutete, dass für jede der beiden Mutationen R6G und InsT23, sowie der kombinierten Mutation R6G/InsT23 eine Marker Transfer Analyse durchgeführt werden sollte.

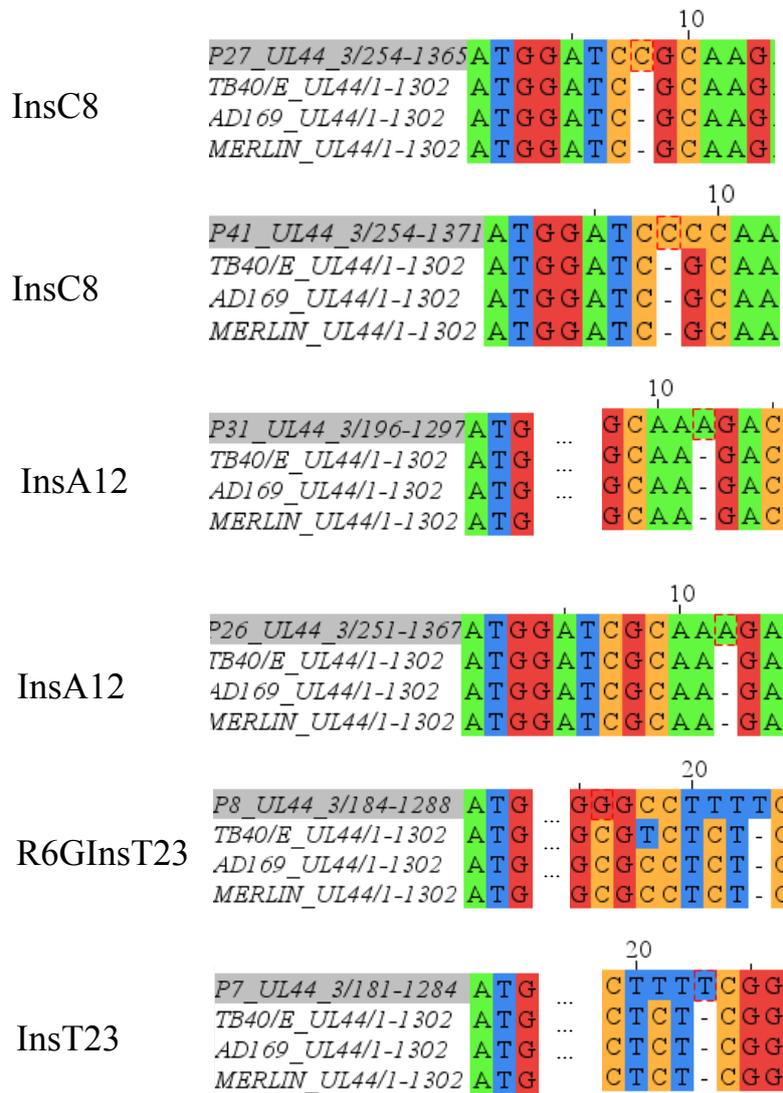


Abbildung 3.3: Mutationen in UL44 aus HCMV-Isolaten: Mutation mit dazugehörigem Alignment (Darstellung aus Jalview)

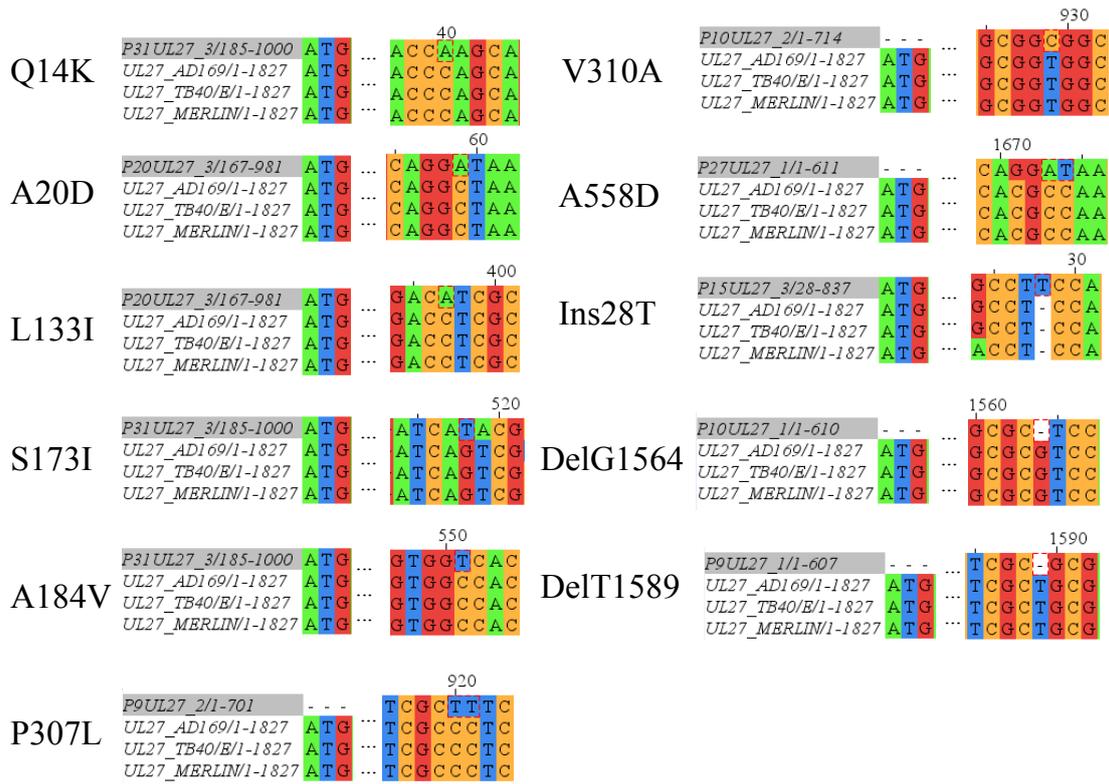


Abbildung 3.4: Mutationen in UL27 aus HCMV-Isolaten: Mutation mit dazugehörigem Alignment (Darstellung aus Jalview)

## **3.2 Generierung von rekombinanten HCMV-Mutanten mit definierten Punktmutationen**

### **3.2.1 Generierung von PCR-Produkten mit definierten Punktmutationen**

Für vier der identifizierten Mutationen in UL27, 5 der identifizierten Mutationen in UL44 und die beiden Mutationen P468Q und A619V in UL97 wurde die Mutagenese-PCR, wie in Abschnitt 2.3.1 auf S.35 beschrieben, durchgeführt. Der Erfolg der Mutagenese-PCR wurde durch Gelelektrophorese überprüft und ist in Abschnitt 2.2.2 auf S.33 beschrieben. Für alle 11 Mutationen konnte PCR-Produkt für die *en-passant* Mutagenese gewonnen werden. Die Gelelektrophorese der PCR-Produkte für die Mutationen InsA12, InsT23 und R6GInsT23 in UL44 und die Mutation InsT28 in UL27 ist in Abbildung 3.5 auf S.56 dargestellt. Die Gelelektrophorese der PCR-Produkte für die Mutation InsC8 in UL44, die Mutationen A20D und A184V in UL27 und die UL97-Mutation A619V ist in Abbildung 3.6 auf S.56 abgebildet. Für die Mutation in R6G UL44 und die Mutation A558D in UL27 ist die Gelelektrophorese in Abbildung 3.7 auf S.57 gezeigt. Die Gelelektrophorese für die UL97-Mutation P468Q ist in Abbildung 3.8 auf S.57 abgebildet.

### **3.2.2 Mutagenese des HCMV-BAC und Kontrolle mittels Sequenzierung**

Bevor die Mutagenese-PCR-Produkte zur Generierung von rekombinanten HCMV-BACs in *E.coli* GS1783/TB40-BAC<sub>KL7</sub>-UL32EGFP eingebracht werden konnten, mussten diese mittels DpnI-Verdau gereinigt werden. Dies erfolgte für alle PCR-Produkte wie in Abschnitt 2.3.2 auf S.37 beschrieben. Jedes PCR-Produkt wurde einzeln in *E.coli* GS1783/TB40-BAC<sub>KL7</sub>-UL32EGFP elektroporiert. Direkt im Anschluss erfolgte die Integration des gesamten PCR-Produktes in das Genom des BACs TB40-BAC<sub>KL7</sub>-UL32EGFP durch den ersten Rekombinationsschritt. Danach erfolgte die Ausplattierung der Bakterien auf LB-Agarplatten mit Kanamycin und

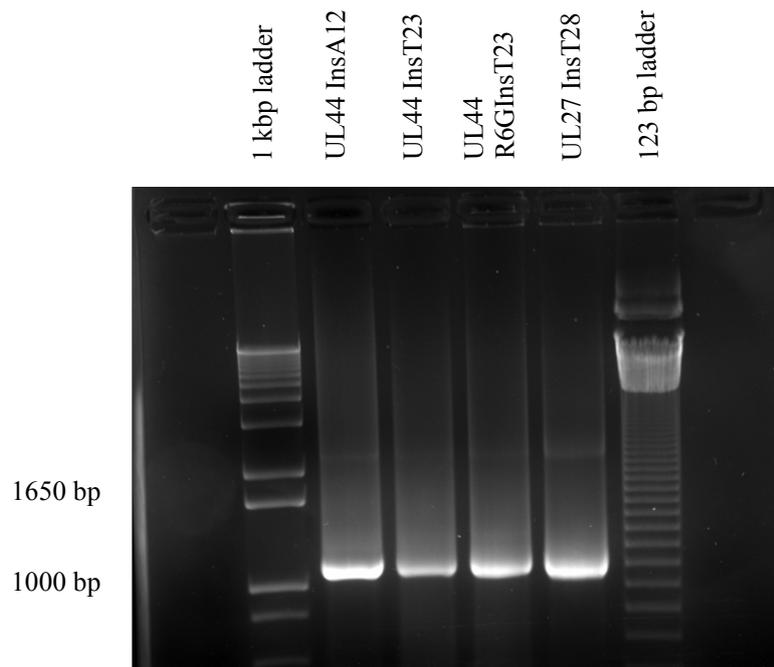


Abbildung 3.5: **PCR für *en-passant* Mutagenese** (Tischer et al.; 2006): Die PCR-Produkte wurden auf ein 1 %-iges Agarosegel geladen und bei 90 V separiert.

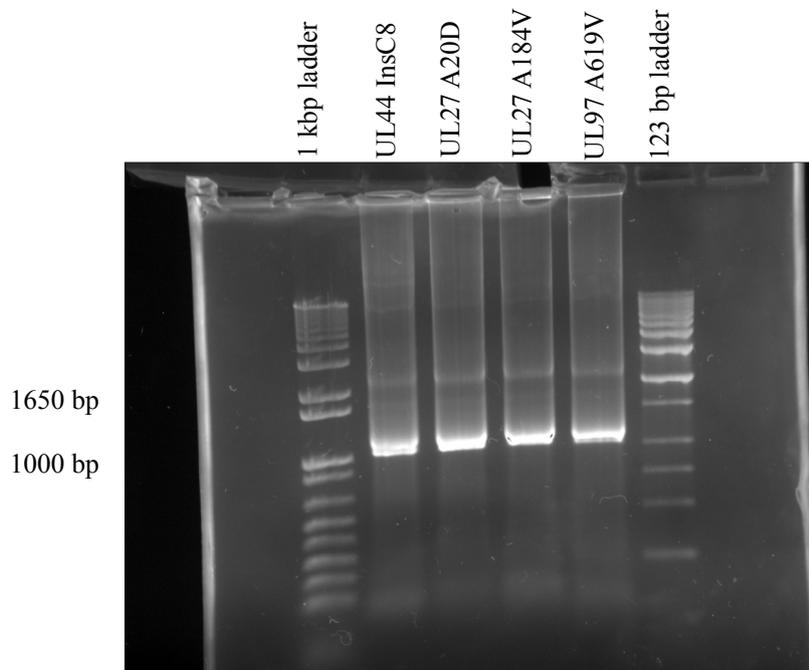


Abbildung 3.6: **PCR für *en-passant* Mutagenese** (Tischer et al.; 2006): Die PCR-Produkte wurden auf ein 1 %-iges Agarosegel geladen und bei 90 V separiert.

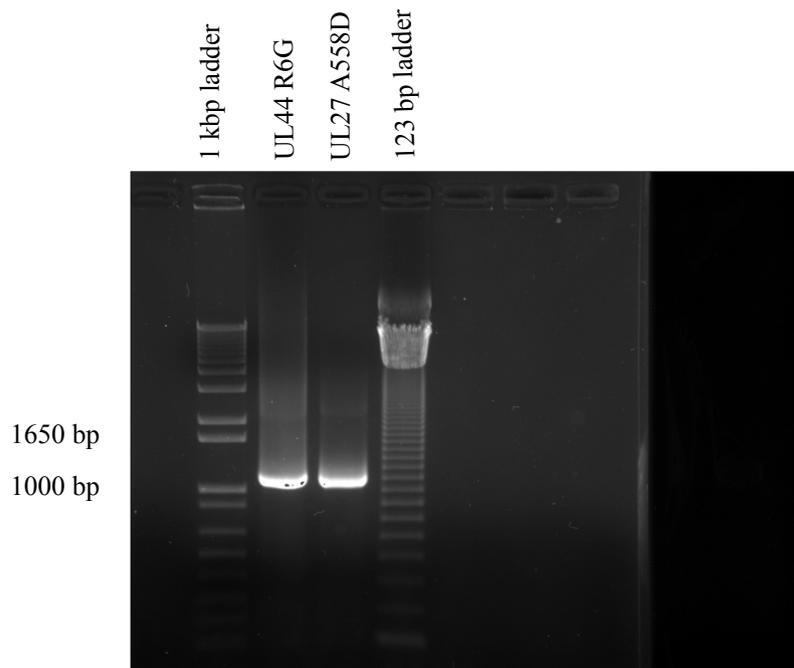


Abbildung 3.7: **PCR für *en-passant* Mutagenese** (Tischer et al.; 2006): Die PCR-Produkte wurden auf ein 1 %-iges Agarosegel geladen und bei 90 V separiert.

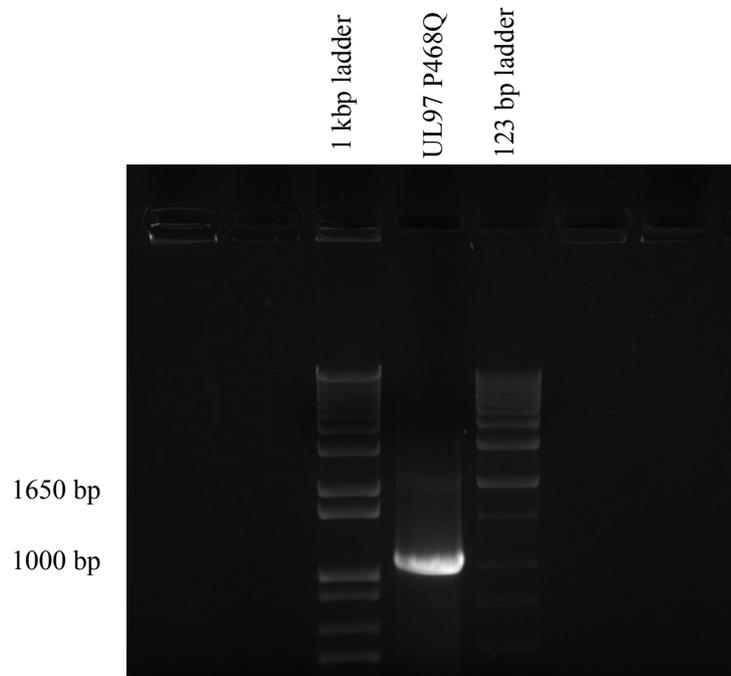


Abbildung 3.8: **PCR für *en-passant* Mutagenese** (Tischer et al.; 2006): Die PCR-Produkte wurden auf ein 1 %-iges Agarosegel geladen und bei 90 V separiert.

Chloramphenicol. Dies erfolgte für alle ausgesuchten Mutationen wie in Abschnitt 2.3.3 auf S.38 beschrieben. Für alle 11 Mutationen konnte am Folgetag bakterielles Wachstum beobachtet werden. Somit war die Einbringung der PCR-Produkte und damit des positiven Selektionsmarkers, eines Kanamycin-Resistenz-Gens, erfolgreich. Nun erfolgte ein zweiter Rekombinationsschritt. Da bei diesem auch der positive Selektionsmarker entfernt wurde, konnte der Erfolg über den Vergleich des bakteriellen Wachstums auf LB-Agarplatten mit nur Chloramphenicol mit dem bakteriellen Wachstum auf LB-Agarplatten mit Chloramphenicol und Kanamycin kontrolliert werden. Dies erfolgte für alle 11 Mutationen wie in Abschnitt 2.3.4 auf S.39 beschrieben. Die Entfernung des positiven Selektionsmarkers verlief für alle 11 Mutationen erfolgreich.

Um sicherzustellen, dass die gewünschte Punktmutation erfolgreich in das HCMV-BAC eingebracht wurde und keine unerwünschten Änderungen der Basensequenz vorhanden waren, erfolgte die Sequenzierung des entsprechenden Genabschnittes von UL27 bzw. UL44. Hierfür wurde die HCMV-BAC-DNA aus Kanamycin-sensiblen Bakterienkolonien mittels Minipräparation isoliert. Dies erfolgte für alle 11 Mutationen wie in Abschnitt 2.3.5 auf S.41 beschrieben. Die Sequenzanalyse zeigte, dass die Mutagenese nur für die Mutationen A20D, A184V und A558D im Gen UL27, die Mutationen InsC8, R6G und InsT23 im Gen UL44 und die beiden UL97-Mutationen P468Q und A619V erfolgreich verlief. Die relevanten Abschnitte der Gensequenz für die Mutationen sind in Abbildung 3.9 auf S.59, Abbildung 3.10 auf S.59, Abbildung 3.11 auf S.60 und Abbildung 3.12 auf S.60 gezeigt.

### **3.2.3 Rekonstitution der generierten HCMV-Mutanten in Zellkultur**

Für alle Mutanten, bei denen die Rekombination der HCMV-TB40-BAC<sub>KL7</sub>-UL32EGFP-DNA erfolgreich verlief, wurde diese, wie in Abschnitt 2.3.6 auf S.42 beschrieben, isoliert. Die Transfektion der rekombinanten BAC-DNA in HFF erfolgte wie in Abschnitt 2.4.2 auf S.44 dargestellt. Um für die phänotypische Charakterisierung als Referenz zu dienen, wurde auch der ursprüngliche Stamm HCMV-TB40-BAC<sub>KL7</sub>-UL32EGFP in HFF transfiziert. Nach erfolgreicher Transfektion konnte das virale Wachstum über die Formierung von Plaques nachgewiesen werden. Die UL27 Mu-

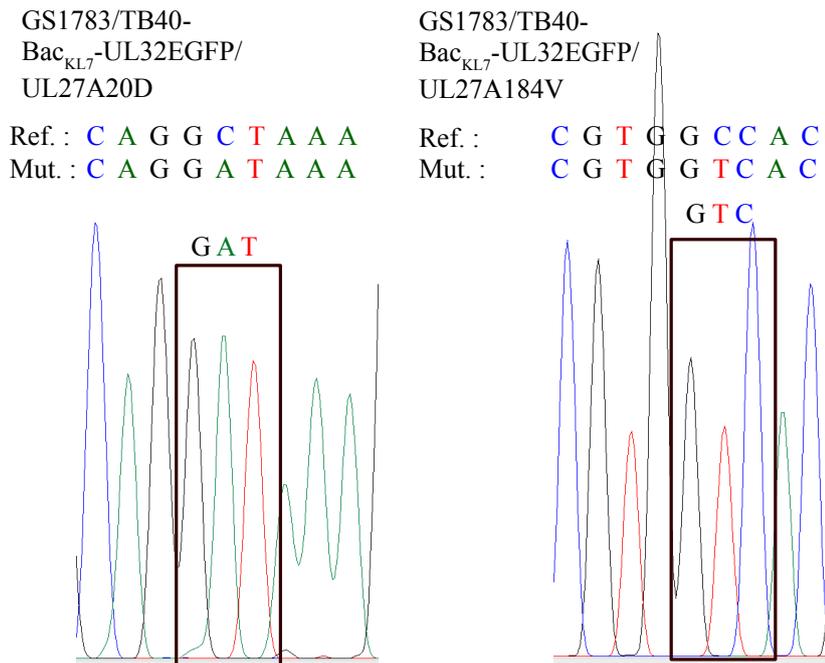


Abbildung 3.9: **Kontrolle der Mutagenese durch Sequenzierung:** Gezeigt ist die Basensequenz der generierten Mutante (Mut.>) im Vergleich zur Referenzsequenz (Ref.:).

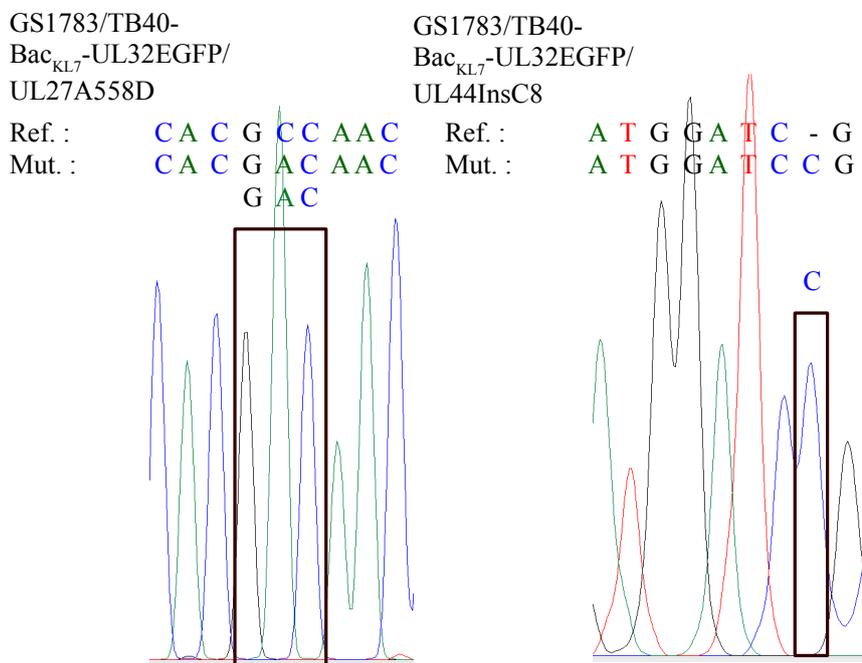


Abbildung 3.10: **Kontrolle der Mutagenese durch Sequenzierung:** Gezeigt ist die Basensequenz der generierten Mutante (Mut.>) im Vergleich zur Referenzsequenz (Ref.:).

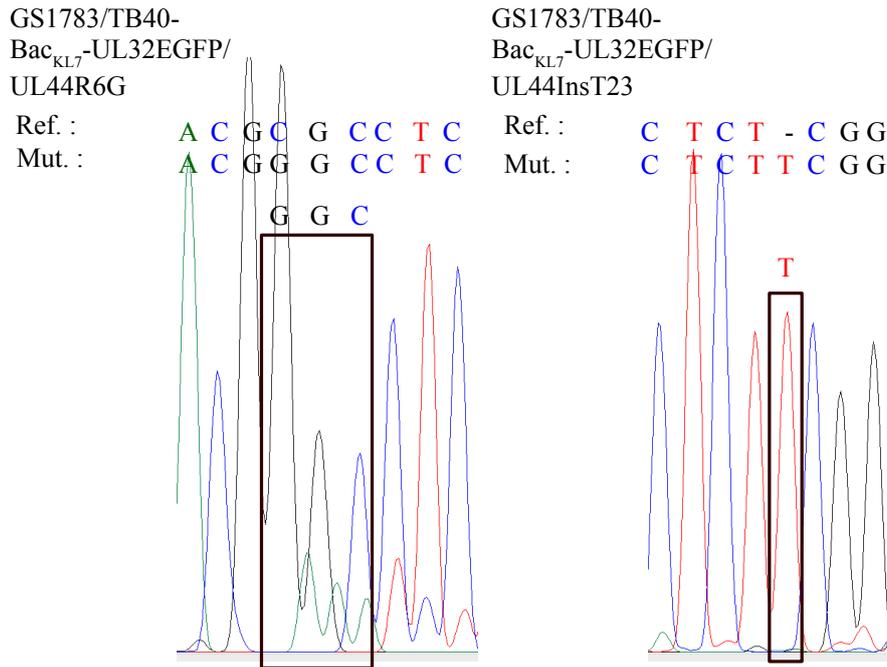


Abbildung 3.11: **Kontrolle der Mutagenese durch Sequenzierung:** Gezeigt ist die Basensequenz der generierten Mutante (Mut.:. ) im Vergleich zur Referenzsequenz (Ref.:).

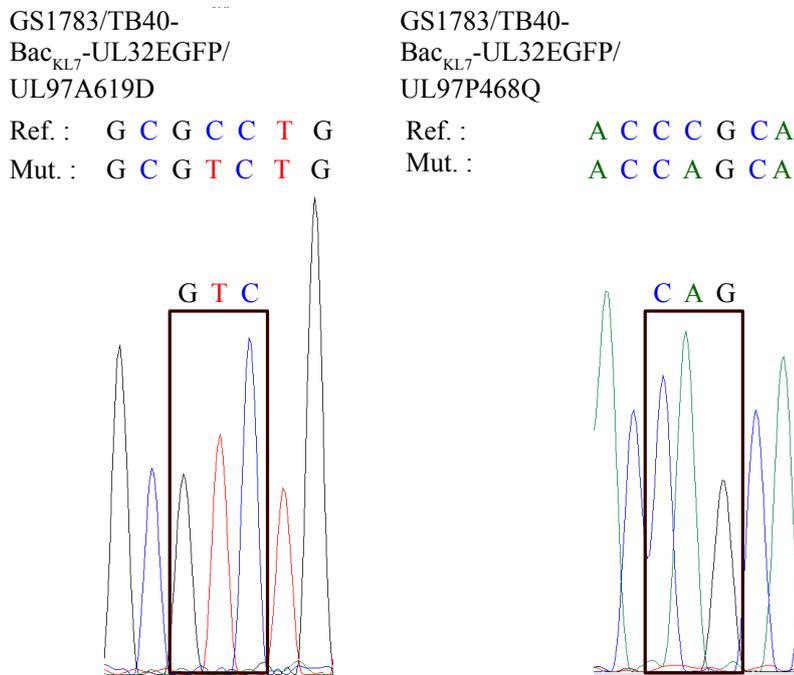


Abbildung 3.12: **Kontrolle der Mutagenese durch Sequenzierung:** Gezeigt ist die Basensequenz der generierten Mutante (Mut.:. ) im Vergleich zur Referenzsequenz (Ref.:).

tation InsT23 lies sich in Zellkultur nicht rekonstituieren. Die Rekonstitution von rekombinantem Virus war für Mutanten mit den Punktmutationen A20D, A184V und A558D im HCMV-Gen UL27 und die beiden UL97-Mutationen A619V und P468Q erfolgreich. Keine Mutante mit Veränderung im HCMV-Gen UL44 konnte in Zellkultur mit HFF rekonstituiert werden.

### 3.3 Phänotypische Charakterisierung der generierten HCMV-Mutanten

#### 3.3.1 Charakterisierung der Wachstumskinetik der generierten HCMV-Mutanten

Die Untersuchung der Auswirkung von eingebrachten Punktmutationen auf die Virusreplikation erfolgte mittels Wachstumsversuchen mit anschließender TCID<sub>50</sub>-Bestimmung. Die Wachstumsversuche wurden durchgeführt, wie in Abschnitt 2.5.2 auf S.47 beschrieben und die TCID<sub>50</sub>-Bestimmungen wurden durchgeführt, wie in Abschnitt 2.5.1 auf S.45 dargestellt. Für jede untersuchte HCMV-Mutation wurden drei unabhängige Assays durchgeführt. Dies erfolgte auch für den Stamm HCMV-TB40-BAC<sub>KL7</sub>-UL32EGFP, welcher als Referenz verwendet wurde. In Tabelle 3.1 auf S.61 sind die log-Werte der TCID<sub>50</sub>/ml jeder der untersuchten HCMV-Mutationen, sowie des Referenzstammes dargestellt. Durch die Auftragung der log-Werte der TCID<sub>50</sub>/ml gegen die Zeit wurden die Wachstumskurven generiert.

Tabelle 3.1: **Wachstumsanalyse der UL27-Mutanten:** Für acht Tage wurde täglich Überstand einer HCMV-infizierten HFF-Kultur abgenommen und der Virustiter je alle 24 h bestimmt. In der Tabelle sind die Durchschnittswerte für 3 unabhängige Assays je Mutante dargestellt. Titer sind in log(TCID<sub>50</sub>/ml) angegeben. Als Referenz wurde der Stamm HCMV-TB40-BAC<sub>KL7</sub>-UL32EGFP verwendet.

Virusstamm	d0	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8
Referenz	4,1	2,35	1,77	2,75	4,77	5,5	5,87	5,83	4,7
A20D	3,93	3,43	2,07	1,77	3,6	4,63	4,93	6,2	5,45
A184V	3,68	1,93	1,4	1,63	4,1	5,53	5,37	5,53	4,7
A558D	3,87	1,27	1,13	3,6	5,87	6,3	5,77	5,93	6,1

Die UL97-Mutationen P468Q und A619V zeigten keine verminderte Replikation. Die Wachstumskinetik war der des Referenzstamms sehr ähnlich und ist in Abbildung 3.13 auf S.62 dargestellt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zum Referenzstamm (Fischer et al.; 2016).

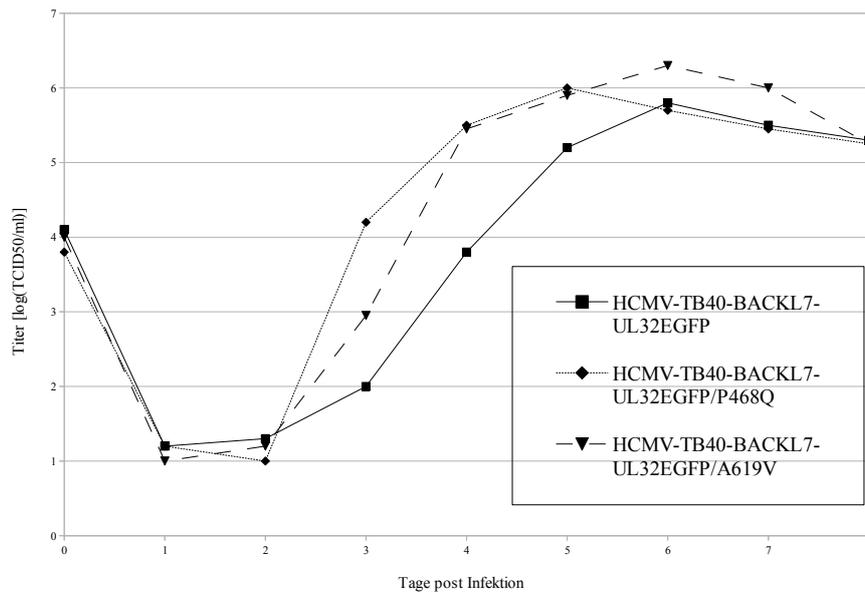


Abbildung 3.13: **Wachstumskurven der UL97-Mutanten:** Für acht Tage wurde täglich Überstand einer HCMV-infizierten HFF-Kultur abgenommen und der Virustiter je alle 24 h bestimmt. Es sind die Durchschnittswerte für 3 unabhängige Assays je Mutante dargestellt. Titer sind in  $\log(\text{TCID}_{50}/\text{ml})$  angegeben. Als Referenz wurde der Stamm HCMV-TB40-BAC<sub>KL7</sub>-UL32EGFP verwendet (Fischer et al.; 2016).

Die Wachstumskinetik der UL27-Mutanten A184V und A558D war der des Referenzstamms sehr ähnlich. An Tag eins bis zwei konnte nur wenig extrazelluläres Virus nachgewiesen werden. Darauf folgte ab Tag 3 ein Titeranstieg, welcher sich für A558D mit einem um 0,85 log-Stufen höheren Wert im Vergleich zur Referenz am deutlichsten abzeichnete. Für den Referenzstamm und die UL27-Mutation A184V zeigte sich der Höhepunkt des Titers an Tag 6 und für die UL27-Mutante A558D an Tag 5. Die UL27-Mutante A20D zeigte eine leicht abweichende Wachstumskinetik im Vergleich zum Referenzstamm. Hier erfolgte der Titeranstieg erst ab Tag 4. Bis zum Höhepunkt des Titers an Tag 7 blieb dieser stets um 0,87 bis 1,17 log-Stufen unterhalb des Referenzwertes, um diesen dann an Tag 7 und 8 zu übersteigen. Die

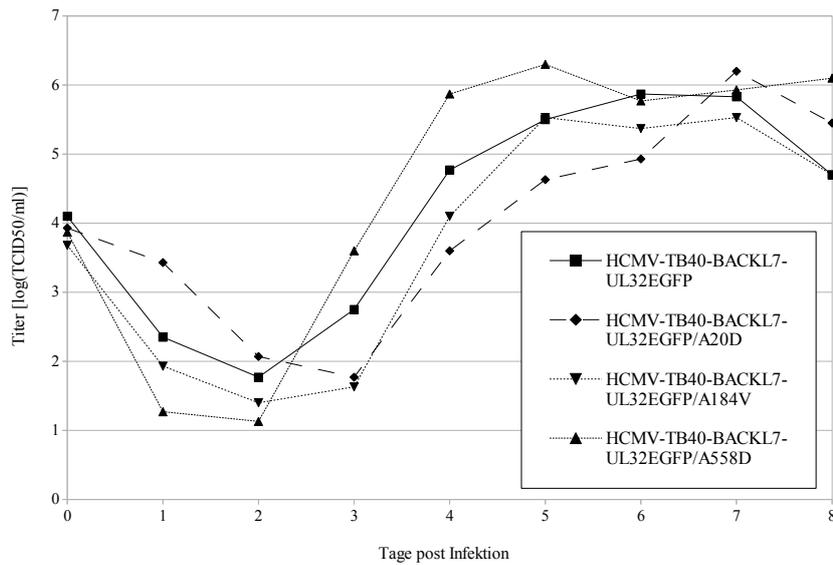


Abbildung 3.14: **Wachstumskurven der UL27-Mutanten:** Für acht Tage wurde täglich Überstand einer HCMV-infizierten HFF-Kultur abgenommen und der Virustiter je alle 24 h bestimmt. Es sind die Durchschnittswerte für 3 unabhängige Assays je Mutante dargestellt. Titer sind in  $\log(\text{TCID}_{50}/\text{ml})$  angegeben. Als Referenz wurde der Stamm HCMV-TB40-BAC<sub>KL7</sub>-UL32EGFP verwendet.

Wachstumskinetik der untersuchten UL27-Mutanten A20D, A184V und A558D zeigte keinen signifikanten Unterschied zum Referenzstamm (Abbildung 3.14 auf S.63).

### 3.3.2 Charakterisierung des Resistenzverhaltens der rekombinanten HCMV-Mutanten gegen GCV, CDV und PFA mittels PRA

Um festzustellen, ob die untersuchten Mutationen eine Resistenz gegen GCV, CDV oder PFA vermitteln können, wurden PRAs durchgeführt. Mindestens 3 unabhängige Assays wurden für jede Mutante durchgeführt, wie in Abschnitt 2.5.3 auf S.47 beschrieben. Mittels Immunfluoreszenz wurde die Formierung von Plaques unter verschiedenen Verdünnungsstufen der Wirkstoffe beobachtet (vgl. Abbildung 3.15 auf S.66). Für alle generierten Mutanten wurde für jeden der drei Wirkstoffe die  $\text{IC}_{50}$  bestimmt. Um die Ratio zu ermitteln wurde für jede Mutante und jeden Wirkstoff der Durchschnitt aus den  $\text{IC}_{50}$ -Werten der durchgeführten Assays gebildet und diese

Tabelle 3.2: **PRA für GCV**: Die  $IC_{50}$ -Werte, sowie 95 % lower bound (LB) und 95 % upper bound (UB) Werte sind für die UL27 Mutationen A20D, A184V und A558D angegeben. Der Durchschnitt aller Assays je Mutante wurde berechnet und die Ratio im Vergleich mit dem Referenzstamm bestimmt. Als Referenz wurde der Stamm HCMV-TB40-BAC<sub>KL7</sub>-UL32EGFP verwendet.

Referenz	$IC_{50}$ [ $\mu$ M]	95 % LB	95 % UB	Durchschnitt	Ratio
Assay 1	1,891	0,639	3,534	2,55 [ $\mu$ M]	-
Assay 2	4,072	3,611	4,565		
Assay 3	0,708	0,517	0,907		
Assay 4	4,18	2,545	6,324		
Assay 5	2,635	2,147	3,076		
Assay 6	1,809	1,539	2,093		

A20D	$IC_{50}$ [ $\mu$ M]	95 % LB	95 % UB	Durchschnitt	Ratio
Assay 1	0,779	0,618	0,956	1,34 [ $\mu$ M]	0,53
Assay 2	2,148	1,711	2,625		
Assay 3	1,248	1,069	1,437		
Assay 4	1,331	0,687	1,841		
Assay 5	1,17	0,957	1,4		

A184V	$IC_{50}$ [ $\mu$ M]	95 % LB	95 % UB	Durchschnitt	Ratio
Assay 1	4,906	2,559	8,619	4,06 [ $\mu$ M]	1,59
Assay 2	2,254	1,021	3,566		
Assay 3	5,03	3,952	6,147		

A558D	$IC_{50}$ [ $\mu$ M]	95 % LB	95 % UB	Durchschnitt	Ratio
Assay 1	2,983	2,018	4,13	2,89 [ $\mu$ M]	1,13
Assay 2	2,334	2,068	2,613		
Assay 3	1,235	0,601	1,995		
Assay 4	5,002	3,559	6,744		

mit dem durchschnittlichen  $IC_{50}$ -Wert des Referenzstamms HCMV-TB40-BAC<sub>KL7</sub>-UL32EGFP verglichen. Eine Ratio von 2 wurde als Resistenz definiert. (Lurain and Chou; 2010)

Für den Referenzstamm HCMV-TB40-BAC<sub>KL7</sub>-UL32EGFP war der  $IC_{50}$ -Wert für GCV 2,55  $\mu$ M, für CDV 0,48  $\mu$ M und für PFA 56,71  $\mu$ M.

Die GCV-Ratio für die UL27-Mutation A20D war 0,53, für die UL27-Mutation A184V 1,59 und für die UL27-Mutation A558D 1,13. Die Ergebnisse der Assays für GCV sind in Tabelle 3.2 auf S.64 zusammengefasst. Die CDV-Ratio für die UL27-Mutation A20D war 1, für die UL27-Mutation A184V 0,44 und für die UL27-

Tabelle 3.3: **PRA für CDV:** Die  $IC_{50}$ -Werte, sowie 95 % lower bound (LB) und 95 % upper bound (UB) Werte sind für die UL27 Mutationen A20D, A184V und A558D angegeben. Der Durchschnitt aller Assays je Mutante wurde berechnet und die Ratio im Vergleich mit dem Referenzstamm bestimmt. Als Referenz wurde der Stamm HCMV-TB40-BAC<sub>KL7</sub>-UL32EGFP verwendet.

Referenz	$IC_{50}$ [ $\mu$ M]	95 % LB	95 % UB	Durchschnitt	Ratio
Assay 1	0,144	0,126	0,167	0,48 [ $\mu$ M]	-
Assay 2	0,471	0,411	0,522		
Assay 3	0,812	0,416	1,227		

A20D	$IC_{50}$ [ $\mu$ M]	95 % LB	95 % UB	Durchschnitt	Ratio
Assay 1	0,815	0,729	0,908	0,48 [ $\mu$ M]	1
Assay 2	0,5	0,421	0,567		
Assay 3	0,113	0,102	0,127		

A184V	$IC_{50}$ [ $\mu$ M]	95 % LB	95 % UB	Durchschnitt	Ratio
Assay 1	0,173	0,149	0,199	0,21 [ $\mu$ M]	0,44
Assay 2	0,273	0,204	0,349		
Assay 3	0,188	0,134	0,262		

A558D	$IC_{50}$ [ $\mu$ M]	95 % LB	95 % UB	Durchschnitt	Ratio
Assay 1	0,743	0,464	1,016	0,58 [ $\mu$ M]	1,21
Assay 2	0,452	0,058	1,241		
Assay 3	0,502	0,291	0,76		
Assay 4	0,849	0,433	1,482		
Assay 5	0,467	0,16	0,896		
Assay 6	0,439	0,233	0,689		
Assay 7	0,648	0,424	0,924		

Tabelle 3.4: **Charakterisierung der UL97-Mutanten:** Mittels PRA erfolgte die Bestimmung der Suszeptibilität für GCV. Die  $IC_{50}$ -Werte wurden als Durchschnittswert aus mindestens drei unabhängigen Assays und die Ratio im Vergleich mit dem Referenzstamm HCMV-TB40-BAC<sub>KL7</sub>-UL32EGFP bestimmt (Fischer et al.; 2016).

Virusstamm	Mutation	$IC_{50}$ [ $\mu$ M]	Ratio
HCMV-TB40-BAC <sub>KL7</sub> -UL32EGFP	-	2,31	-
HCMV-TB40-BAC <sub>KL7</sub> -UL32EGFP/P468Q	P468Q	4,08	1,77
HCMV-TB40-BAC <sub>KL7</sub> -UL32EGFP/A619V	A619V	3,72	1,61

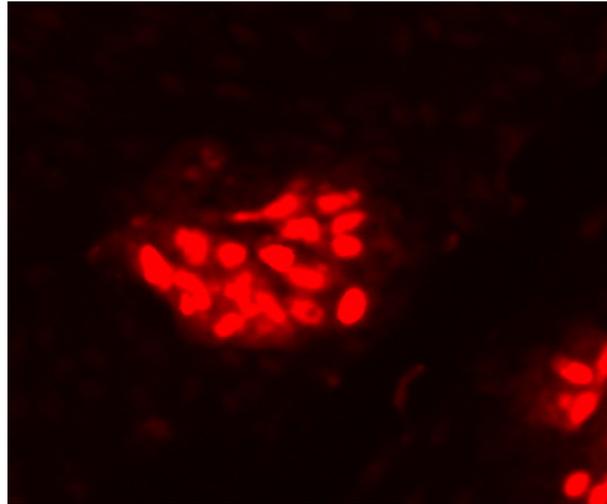


Abbildung 3.15: **Plaueformierung im HFF/ARPE-19 Assay:** Mit HCMV infizierte HFF wurden mit nicht-infizierten ARPE-19 Zellen auf einer 96-well Mikrokulturplatte ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von 7 Tagen wurden Plaques mittels Immunfluoreszenz ausgezählt.

Tabelle 3.5: **PRA für PFA:** Die  $IC_{50}$ -Werte, sowie 95 % lower bound (LB) und 95 % upper bound (UB) Werte sind für die UL27 Mutationen A20D, A184V und A558D angegeben. Der Durchschnitt aller Assays je Mutante wurde berechnet und die Ratio im Vergleich mit dem Referenzstamm bestimmt. Als Referenz wurde der Stamm HCMV-TB40-BAC<sub>KL7</sub>-UL32EGFP verwendet.

Referenz	$IC_{50}$ [ $\mu$ M]	95 % LB	95 % UB	Durchschnitt	Ratio
Assay 1	36,321	27,187	43,919	56,71 [ $\mu$ M]	-
Assay 2	57,171	46,533	67,056		
Assay 3	59,745	46,997	71,777		
Assay 4	48,181	42,985	52,701		
Assay 5	82,12	75,063	89,31		
A20D	$IC_{50}$ [ $\mu$ M]	95 % LB	95 % UB	Durchschnitt	Ratio
Assay 1	47,186	40,536	52,346	47,06 [ $\mu$ M]	0,83
Assay 2	59,207	46,087	72,326		
Assay 3	34,776	25,218	42,042		
A184V	$IC_{50}$ [ $\mu$ M]	95 % LB	95 % UB	Durchschnitt	Ratio
Assay 1	43,965	35,791	49,911	49,76 [ $\mu$ M]	0,88
Assay 2	33,3	24,224	40,243		
Assay 3	72,022	58,043	85,414		
A558D	$IC_{50}$ [ $\mu$ M]	95 % LB	95 % UB	Durchschnitt	Ratio
Assay 1	23,883	10,003	33,439	40,11 [ $\mu$ M]	0,71
Assay 2	45,704	39,755	50,595		
Assay 3	50,73	41,062	59,25		

Mutation A558D 1,21. Die Ergebnisse der Assays für GCV sind in Tabelle 3.3 auf S.65 zusammengefasst. Die PFA-Ratio für die UL27-Mutation A20D war 0,83, für die UL27-Mutation A184V 0,88 und für die UL27-Mutation A558D 0,71. Die Ergebnisse der Assays für GCV sind in Tabelle 3.5 auf S.66 zusammengefasst.

Die Ratios der untersuchten UL27-Mutationen lagen für die Wirkstoffe GCV, CDV und PFA unter 2. Damit zeigten sich die UL27-Mutationen A20D, A184V und A558D als suszeptibel gegenüber GCV, CDV und PFA.

Für die UL97-Mutanten P468Q und A619V wurden nur PRAs mit GCV durchgeführt. Für P468Q ergab sich eine Ratio von 1,77 und für A619V eine Ratio von 1,61 (Tabelle 3.4 auf S.65). So konnten beide untersuchten UL97-Mutationen als GCV-sensitiv charakterisiert werden (Fischer et al.; 2016).

# 4 Diskussion

## 4.1 Analyse der HCMV-Isolate

In der menschlichen Population ist HCMV weltweit verbreitet. Die Seroprävalenz variiert abhängig vom sozio-ökonomischen Status und dem Entwicklungsstand des Landes. Sie steigt mit zunehmendem Alter an und erreicht in Entwicklungsländern annähernd 100 % im Erwachsenenalter (Boppana and Fowler; 2007; Griffiths et al.; 2015). Ob eine Erkrankung ausbricht, ist wesentlich vom Immunstatus des Patienten abhängig. Bei Immunkompetenz verläuft die Primärinfektion meist asymptomatisch, führt aber zu einer lebenslangen Latenz (Mocarski; 2002; Reddehase; 2002). Patienten mit eingeschränkter Immunfunktion, wie Knochenmarks- oder Organtransplantierte, AIDS-Patienten oder Frühgeborene laufen Gefahr eine lebensbedrohlichen HCMV-Erkrankung zu erleiden, wobei auf Grund des breiten Zelltropismus des Virus jedes Organsystem betroffen sein kann. In diesen Fällen stehen zur Prophylaxe und Therapie GCV, CDV und PFA zur Verfügung.

Die viralen Gene UL97 und UL54 kodieren für die virale Phosphotransferase pUL97 und die virale DNA-Polymerase pUL54 (Shi et al.; 2006; Wolf et al.; 2001). Mutationen in diesen Genen sind dafür bekannt, Resistenzen gegen antivirale Therapeutika zu vermitteln (Chou et al.; 1995; Lurain and Chou; 2010). Die Untersuchung von HCMV-Isolaten von Patienten mit kongenitaler HCMV-Infektion und Patienten nach Stammzelltransplantation am Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten, Tübingen zeigten in einigen Fällen phänotypisch eine Resistenz gegenüber GCV, ohne das eine korrespondierende Mutation im UL97- oder UL54-Gen nachgewiesen werden konnte. Da die Genprodukte der viralen Gene UL27 und UL44 direkt mit der viralen Phosphotransferase pUL97 oder der viralen DNA-Polymerase pUL54 interagieren, sollten diese auf eine mögliche Resistenzvermittlung untersucht werden.

Ziel der Arbeit war es die viralen Gene UL27 und UL44 von 12 HCMV-Isolaten auf Veränderungen der Sequenz zu untersuchen und gefundene Mutationen mittels

Marker Transfer Analyse auf mögliche Resistenzen gegen GCV, CDV und PFA zu testen.

Nach Extraktion der DNA aus Zellkulturüberständen und Amplifikation der viralen Gene UL27 und UL44 mittels PCR erfolgte die Sequenzierung durch die Firma GATC Biotech, Konstanz. Als Referenzstämme dienten die gegen HCMV-Therapeutika suszeptiblen Stämme AD169, MERLIN und TB40/E. Mittels Multiple Sequenz Alignment wurden die, durch Sequenzierung gewonnen, UL27- und UL44-Basensequenzen der HCMV-Isolate mit den entsprechenden Sequenzen der Laborstämme verglichen. Hierfür wurde das Programm ClustalOmega verwendet, welches über den Webservice des European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), Hinxton lief. Die Auswertung der Alignments erfolgte manuell mit dem Programm Jalview. Nur Basenaustausche, welche durch Veränderung des Codons zu einer geänderten Aminosäuresequenz führten und in keinem der Referenzstämme zu finden waren, wurden für die Marker Transfer Analyse in Betracht gezogen.

Auf diese Art und Weise konnten für das virale Gen UL27 die 11 Mutationen Q14K, A20D, L133I, S173I, A184V, V310A, A558D, Ins28T, DelG1564 und DelT1589 identifiziert werden. Diese befinden sich zum überwiegenden Teil im anfänglichen bis mittleren Abschnitt des Gens. Die Mutationen InsT28, DelG1564 und DelT1589 gehen auf Grund des Verlusts oder dem Zugewinn einer Base in der Sequenz mit einem *reading frame shift* im nachfolgenden Genabschnitt einher. Dies kann zu einem funktionslosen Protein führen. Trotzdem erscheint das Auftreten eines solchen HCMV-Stamms möglich, da UL27 für die Replikation von HCMV *in vivo* nicht von elementarer Bedeutung zu sein scheint. (Prichard et al.; 2006)

Für das virale Gen UL44 zeigten sich in den HCMV-Isolaten die 4 Mutationen InsC8, InsA12, InsT23 und die kombinierte Mutation R6G/InsT23. Jede der Insertionen wurde in zwei verschiedenen Patientenproben gefunden. Alle identifizierten UL44 Mutationen befinden sich in Anfangsbereich des Gens. UL44 zeigt einen geringen Polymorphismus und kodiert für einen Teil des viralen Replikationskomplexes (Anders and Gibson; 1988; Boutolleau et al.; 2009; Woon et al.; 2008). Durch die Insertionen kommt es im nachfolgenden Genabschnitt zu einem *reading frame shift* und dies kann mit Verlust oder Einschränkung der Proteinfunktion einhergehen. Somit scheint zumindest eine Einschränkung der Replikation wahrscheinlich. Die Identifikation

solch einer Mutation, die mit einer stark veränderten Proteinstruktur einhergeht, kann durch Mischinfektion mit HCMV-Stämmen mit unterschiedlichen UL44 Sequenzen erklärt werden. Alle gefundenen UL44 Mutationen kamen in Mischpopulation vor. Für die 12 HCMV-Isolate konnten 11 Mutationen im viralen Gen UL27 und 4 Mutationen im viralen Gen UL44 identifiziert werden. Für die weitere Charakterisierung wurden die UL27-Mutationen InsT28, A20D, A184V und A558D, sowie die UL44-Mutationen InsC8, InsA12, R6G, InsT23 und R6G/InsT23 ausgewählt.

## **4.2 Generierung von rekombinanten HCMV-Mutanten mit definierten Punktmutationen**

Um die Auswirkung der identifizierten Mutationen auf die Wachstumskinetik und das Resistenzverhalten mittels phänotypischer Assays zu untersuchen, mussten diese Punktmutationen in ein HCMV-Referenzgenom eingebracht werden. Hierfür wird ein gegenüber HCMV-Therapeutika suszeptibler Laborstamm ausgewählt und die Ergebnisse der phänotypischen Untersuchungen der generierten Mutanten werden mit den Ergebnissen dieses Referenzstamms verglichen. Somit kann sichergestellt werden, dass die definierte Punktmutation ursächlich für etwaige Veränderungen dieser Parameter ist. In dieser Arbeit wurde die, von Tischer et al., 2006 beschriebene und 2010 aktualisierte, Methode der *en-passant*-Mutagenese zu Generierung von HCMV-Mutanten mit definierten Punktmutationen genutzt (Tischer et al.; 2010, 2006). Hierbei wird das als BAC in *E.coli* GS1783 vorliegende Virusgenom modifiziert, ohne das unerwünschte Sequenzen eingebracht werden, weswegen diese Methode älteren gegenüber zu bevorzugen ist (Tischer and Kaufer; 2012). Die Mutagenese des BACs erfolgt in zwei Teilschritten. Zuerst wird ein PCR-Produkt, welches die gewünschte Mutation und einen positiven Selektionsmarker enthält, mittels Elektroporation in *E.coli* GS1783 eingebracht und es erfolgt der erste Rekombinationsschritt. Dieser kann temperaturabhängig initiiert werden, da *E.coli* GS1783 über Rekombinationsgene eines  $\alpha$ -Prophagen verfügt, welche unter der Regulation eines temperaturabhängigen Promoter stehen. So kommt es zur Integration des PCR-Produktes in das BAC-

Genom. Über eine positive Selektion anhand des eingebrachten Selektionsmarkers lässt sich der Erfolg kontrollieren. In diesem Fall handelte es sich um eine Kanamycin-Resistenz. Nach dem zweiten Rekombinationsereignis ist die definierte Punktmutation die einzige Veränderung des BAC-Genoms, da in diesem Schritt Fremdsequenzen, einschließlich des positiven Selektionsmarkers, entfernt werden. Auf Grund dessen kann der Erfolg des zweiten Rekombinationsschrittes mittels einer negativen Selektion überprüft werden.

Die Generierung von PCR-Produkten für die Mutagenese erfolgte für die UL27-Mutationen InsT28, A20D, A184V und A558D, für die UL44-Mutationen InsC8, InsA12, R6G, InsT23 und R6G/InsT23, sowie für die UL97-Mutationen P468Q und A619V. Der Erfolg der Mutagenese-PCR konnte durch Gelelektrophorese überprüft werden. Nach Einbringung der PCR-Produkte in *E.coli* GS1783 mittels Elektroporation wurden die beiden Rekombinationsschritte durchlaufen und der Erfolg derselben durch positive und negative Selektion überprüft.

Vor der Rekonstitution von rekombinantem Virus erfolgte noch die Kontrolle, ob die gewünschte Mutation wirklich in das BAC-Genom integriert wurde. Hierzu wurde die BAC-DNA für jede Mutation isoliert und mittels Sequenzierung auf das Vorhandensein der gewünschten Mutation untersucht. Für die UL27-Mutationen A20D, A184V und A558D, die UL44-Mutationen InsC8, R6G und InsT23, sowie die UL97-Mutationen P468Q und A619V konnte die gewünschte Mutation durch Sequenzanalyse nachgewiesen werden. Für die UL27-Mutation InsT28 und die UL44-Mutationen InsA12 und R6G/InsT23 war dies jedoch nicht der Fall, obwohl die positive Selektion nach dem ersten Schritt der Rekombination und die negative Selektion nach dem zweiten Schritt der Rekombination beide erfolgreich durchlaufen wurden. Bei der *en-passant*-Mutagenese ist es möglich, dass das PCR-Produkt nur teilweise in das BAC-Genom integriert wird. Dies ist abhängig vom Verhältnis des GC-Gehaltes des PCR-Produktes im Bereich des Selektionsmarkers zum GC-Gehalt in den Randbereichen. Bei höherem GC-Gehalt im inneren Bereich wird die I-Sce-I-Erkennungssequenz mit dem positiven Selektionmarker in das BAC-Genom integriert und die gewünschte Mutation im Randbereich jedoch nicht. Durch diese unvollständige Integration des PCR-Produktes in das BAC-Genom fallen diese während der positiven und negativen Selektionsschritte nicht auf, obwohl die Mutation

nicht in das BAC-Genom integriert wurde (Fischer; 2015).

Für die UL27-Mutationen A20D, A184V und A558D, die UL97-Mutationen P468Q und A619V, sowie die UL44-Mutationen InsC8, R6G und InsT23 folgte nun die Transfektion des rekombinanten HCMV-BAC in HFF. Für alle drei UL27-Mutationen und beide UL97-Mutationen verlief die Rekonstitution erfolgreich und Plaqueformierung konnte nach 2-5 Wochen in Zellkultur beobachtet werden. Keine der UL44-Mutationen lies sich nach Transfektion in HFF in Zellkultur rekonstituieren. Da pUL44 Teil des viralen Replikationskomplexes ist und es bei den beiden UL44-Mutationen InsC8 und InsT23 zu einem *reading frame shift* nach der Insertion kam, was eine veränderte Aminosäuresequenz des Genproduktes zu Folge hat, ist eine verminderte Replikationsfähigkeit der HCMV-Mutante wahrscheinlich (Anders and Gibson; 1988). Bei der UL44-Mutation R6G wird im N-terminalen Bereich der Aminosäuresequenz von pUL44 an Position 6 Arginin durch Glycin ersetzt, wobei die restliche Sequenz unverändert vorliegt. Auch hier war eine Rekonstitution in Zellkultur nicht möglich. Es besteht die Möglichkeit, dass die Transfektion trotz multipler Versuche in unabhängigen Ansätzen fehlerhaft durchgeführt wurde. Allerdings könnte auch die Funktion des Proteins durch eine Mutation beeinträchtigt sein. Mehrere Mechanismen sind dafür vorstellbar. pUL44 findet sich in infizierten Zellen im Zellkern und wirkt dort an der viralen Replikation mit. Für den Transport in den Nukleus besitzt pUL44 eine Kernlokalisationssequenz. Eine Mutation in dieser könnte sich auf die Lokalisation des Proteins am Funktionsort auswirken und somit die Replikation behindern. Allerdings wurde gezeigt, dass es sich bei dieser Kernlokalisationssequenz um die Aminosäuren 425-431 handelt und somit kann dieser Mechanismus für die UL44-Mutation R6G ausgeschlossen werden (Alvisi et al.; 2005). pUL44 bildet Homodimere welche über die N-terminalen Enden mit der viralen Polymerase pUL54 interagieren (Sinigalia et al.; 2008; Woon et al.; 2008). Eine Mutation, welche die Dimerbildung inhibiert, könnte darüber den Replikationsmechanismus beeinträchtigen. Zwar befinden sich die Bindungsstellen im N-terminalen Abschnitt von pUL44, jedoch sind als verantwortliche Aminosäuren P85, L86, L87, L93, F121 und M123 identifiziert worden. (Appleton et al.; 2004) Deswegen erscheint dieser Mechanismus für die UL44-Mutation R6G unwahrscheinlich. Ein weiterer, replikationsbehindernder Mechanismus ist die Inhibition der Interaktion zwischen pUL44 und der viralen

Polymerase pUL54. Dies ist zwar durch einen einzigen Aminosäureaustausch möglich, allerdings befindet sich dieser Bereich, auch als *connector loop* bezeichnet, von Aminosäure 129 bis 140 (Loregian et al.; 2004). So erscheint auch dieser Mechanismus als unwahrscheinlich. Als weiteres könnte sich eine Mutation auf die Fähigkeit von pUL44 DNA zu binden auswirken. Es konnte gezeigt werden, dass pUL44 über ein  $\alpha$ -helikales Äußeres verfügt, worüber mittels elektrostatischer Interaktionen ein Gleiten am Rückrat der DNA möglich wäre. Diese Interaktionen scheinen über Arginin- und Lysin-Reste vermittelt (Appleton et al.; 2004). Die höchsten Wahrscheinlichkeiten für das Ausbilden von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen pUL44 und DNA liegen bei den Lysin- und Arginin-Resten zwischen Position 163 bis 174 (Komazin-Meredith et al.; 2008). Zwar führt die UL44-Mutation zu einem Wegfall eines Arginin-Restes an Position 6, aber die Strukturanalyse von Appleton et al., schloss am N-terminalen Ende keine Positionen ab 10 mit ein, weswegen über die Beteiligung des Arginin-Restes an Position 6 an der Oberflächenstruktur des gefalteten Proteins pUL44 nur spekuliert werden kann (Appleton et al.; 2004).

## **4.3 Phänotypische Charakterisierung der generierten HCMV-Mutanten**

### **4.3.1 Charakterisierung der Wachstumskinetik der rekombinanten HCMV-Mutanten**

Für die antivirale Therapie einer HCMV-Erkrankung ist die Wachstumskinetik des Virus von Bedeutung. Schnell replizierende Stämme führen unter Standarddosis häufiger zu einem Therapieversagen und langsam replizierende Stämme lassen sich einfacher therapieren. Somit können sowohl eine Resistenz des Virus gegen medikamentöse Therapie, als auch das Wachstumsverhalten Einfluss auf den klinischen Verlauf nehmen.

Die in dieser Arbeit generierten UL27-Mutanten A20D, A184V und A558D und UL97-Mutanten P468Q und A619V wurden in Bezug auf ihre Wachstumskinetik charakterisiert. Als Referenz diente der Stamm HCMV-TB40-BAC<sub>KL7</sub>-UL32EGFP. Die UL27-Mutation A184V zeigte einen ähnlichen Verlauf wie der Referenzstamm.

Virustiter im Überstand waren durchschnittlich um 0,41 log-Stufen niedriger als die des Referenzstamms, allerdings wurde A184V auch mit einer niedrigeren MOI beimpft. Die Unterschiede verschwanden an Tag acht. UL27-Mutation A558D zeigte von Tag eins bis zwei geringere Virustiter als der Referenzstamm. Diese stiegen jedoch schnell bis zu einem Höhepunkt an Tag 5 im Vergleich zur Referenz an Tag 6 an. Für Mutation A20D in UL27 zeigte der Virustiteranstieg im Überstand an Tag vier und damit einen Tag später als beim Referenzstamm. Der Höhepunkt trat ebenfalls einen Tag später an Tag sieben auf. Die Unterschiede glichen sich aber an Tag sieben und acht an. Auch die generierten UL97-Mutanten P468Q und A619V zeigten eine ähnliche Wachstumskinetik wie der Referenzstamm. An Tag drei bis fünf ließ sich für beide rekombinanten Stämme ein höherer Titer im Überstand nachweisen, allerdings glichen sich diese Unterschiede für P468Q an Tag sechs und für A619V an Tag acht wieder an (Fischer et al.; 2016).

Insgesamt zeigte sich für die untersuchten Mutationen kein signifikanter Unterschied in der Replikationskinetik im Vergleich zum Referenzstamm. Dieses Ergebnis war bei den UL27-Mutanten zu erwarten, da UL27 für die Replikation nicht essentiell ist (Prichard et al.; 2006). Für die Übertragung auf die Klinik ist zu beachten, dass die Wachstumskinetik hier *in vitro* mit HFF als Zielzellen charakterisiert wurde. Es besteht die Möglichkeit, dass sich Ergebnisse *in vivo* von den hier gezeigten unterscheiden können.

### **4.3.2 Charakterisierung des Resistenzverhaltens der rekombinanten HCMV-Mutanten gegen GCV, CDV und PFA**

Erkrankungen durch HCMV treten in der Regel nur bei Patienten mit eingeschränktem Immunstatus auf und können sich als lebensbedrohliche Organmanifestationen darstellen. Für die Therapie oder Prophylaxe in solchen Fällen sind die drei Medikamente GCV, CDV und PFA zugelassen. Ein Therapieversagen kann durch ein starkes Defizit des Immunsystems des Patienten, zu geringe Wirkdosen der Therapeutika oder aber resistenzvermittelnden Mutationen des Virus bedingt sein. Die viralen Gene UL97 für die Serin/Threonin-Phosphotransferase und UL54 für die virale DNA-Polymerase sind als mögliche Träger von Resistenz-assoziierten Mutatio-

nen bekannt. Nicht jede Mutation kann eine Resistenz gegen HCMV-Therapeutika vermitteln. Für die Unterscheidung zwischen Resistenz-assoziiierter Mutation und Polymorphismus ist eine phänotypische Charakterisierung unerlässlich.

Die untersuchten UL97-Mutationen P468Q und A619V liegen außerhalb der konservierten Regionen des Gens UL97. In der phänotypischen Charakterisierung für die Suszeptibilität für GCV ergab sich für P468Q eine Ratio von 1,77 und für A619V eine Ratio von 1,61. Damit liegen beide Ratios unter dem Grenzwert von 2. Beide Mutationen sind als suszeptibel gegenüber GCV einzuordnen (Fischer et al.; 2016). Der Nachweis einer dieser beiden Mutationen in der Klinik steht also einer Therapie mit GCV nicht im Wege. Eine phänotypische Charakterisierung von UL97-Mutationen in Bezug auf CDV und PFA kann auf Grund des Wirkmechanismus und der fehlenden Interaktion zwischen den Medikamenten und der viralen pUL97 Phosphotransferase unterlassen werden.

Für diese Arbeit sollten die generierten HCMV-Mutanten mit UL27-Mutationen A20D, A184V und A558D auf mögliche Resistenzen gegen GCV, CDV und PFA untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden PRA durchgeführt, wobei infizierte HFF mit nicht infizierten ARPE-19 in einem 96-well Format angesetzt wurden und über die Formierung von Plaques bei verschiedenen Verdünnungsstufen der Therapeutika die  $IC_{50}$  berechnet wurden. Je Mutation und antiviralem Agens wurden mindestens drei unabhängige Assays durchgeführt. Durch den Vergleich der  $IC_{50}$  der Mutante mit der  $IC_{50}$  des Referenzstamms ergibt sich die Ratio. Eine Resistenz liegt ab einer Ratio von 2 vor (Lurain and Chou; 2010).

Die GCV-Ratio der Mutation A20D war 0,53, die CDV-Ratio war 1 und die PFA-Ratio war 0,83. Die GCV-Ratio der Mutation A184V war 1,59, die CDV-Ratio war 0,44 und die PFA-Ratio war 0,88. Die GCV-Ratio der Mutation A558D war 1,13, die CDV-Ratio war 1,21 und die PFA-Ratio war 0,71. Bei allen untersuchten Mutationen lagen die Ratios unter 2. So sind die UL27-Mutationen als suszeptibel gegenüber GCV, CDV und PFA einzuordnen. Auf Grund des Wirkmechanismus von CDV und PFA, welche beide direkt mit der viralen DNA-Polymerase interagieren und entweder, wie im Falle von PFA, keiner vorheriger Aktivierung bedürfen oder diese, wie bei CDV, durch zelleigene Enzyme stattfindet, war das Auftreten einer Resistenz durch eine Mutation in UL27 unwahrscheinlich. Von größerem Interesse war die Charakterisierung in

Bezug auf Resistenz gegen GCV, da bei der phänotypischen Untersuchung der HCMV-Isolate, in welchen die Mutationen gefunden wurden, eine GCV-Resistenz nachweisbar war. Da die in dieser Arbeit generierten HCMV-Mutanten keine GCV-Resistenz aufwiesen, ist davon auszugehen, dass die untersuchten Mutationen nicht ursächlich für die vorhergehende Beobachtung waren.

Nicht alle der identifizierten Mutationen in UL27 der HCMV-Isolate wurden im Rahmen dieser Arbeit charakterisiert. Um das Auftreten einer Resistenz auf Basis einer dieser anderen UL27-Mutationen auszuschließen, sollte dies noch erfolgen. Ebenfalls wurde die Resistenz der generierten HCMV-Mutanten gegenüber Maribarvir nicht untersucht. Mutationen in im Gen UL27 können eine solche Resistenz vermitteln (Chou et al.; 2004; Komazin et al.; 2003). Durch die Durchführung einer phänotypischen Charakterisierung wäre es bei Einführung des Medikaments möglich, diese Mutationen mittels genotypischer Verfahren einzuordnen.

## 5 Zusammenfassung

Eine Infektion mit humanem Cytomegalovirus (HCMV) verläuft bei immunkompetenten Patienten trotz lebenslanger Latenz meist inapparent. Bei immunsupprimierten Patienten jedoch kann eine Primärinfektion oder eine Virusreaktivierung zu schwerwiegenden Verläufen führen. Die Resistenzentwicklung von HCMV gegen die zugelassenen Virostatika Ganciclovir (GCV), Cidofovir (CDV) und Foscarnet (PFA) ist für die Therapie und den klinischen Verlauf von entscheidender Bedeutung. Molekulare Grundlage der Resistenzentwicklung sind Punktmutationen oder Deletionen im viralen DNA-Polymerasegen UL54 und im viralen Phosphotransferasegen UL97. Im Falle eines Therapieversagens ist es wichtig, den Phänotyp nachgewiesener Mutationen zu kennen, damit eine adäquate Therapieanpassung erfolgen kann. Aus diesem Grund ist es notwendig, dass neu detektierte Mutationen mittels Marker Transfer Analyse phänotypisch charakterisiert werden. Nur so ist es möglich, zwischen resistenzvermittelnden Mutationen und Polymorphismen zu unterscheiden.

Am Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten, Tübingen wurden die UL97-Mutationen P468Q und A619V identifiziert, welche von resistenten HCMV-Isolaten stammten. Diese Mutationen wurden in dieser Arbeit mittels Marker Transfer Analyse untersucht. Weiterhin zeigte sich bei der Untersuchung von HCMV-Isolaten in einigen Fällen eine phänotypische GCV-Resistenz, ohne dass eine korrespondierende Mutation in UL97 oder UL54 nachgewiesen werden konnte. Auf Grund der unklaren Rolle der viralen Gene UL27 und UL44 bei der Resistenzentwicklung sollten diese bei den entsprechenden HCMV-Isolaten sequenziert werden, da die Genprodukte von UL27 und UL44 mit der viralen Phosphotransferase oder der viralen DNA-Polymerase interagieren. Noch unbeschriebene Mutationen in UL27 und UL44 sollten mittels Marker Transfer Analyse charakterisiert werden.

Mittels Sequenzanalyse konnten für die HCMV-Isolate die UL27-Mutationen Q14K, A20D, L133I, S173I, A184V, V310A, A558D, InsT28, DelG1564 und DelT1589 identifiziert werden. Für UL44 zeigten sich die Mutationen InsC8, InsA12, InsT23 und R6G/InsT23. Durch Marker Transfer Analyse sollten die UL27-Mutationen

InsT28, A20D, A184V und A558D, sowie die UL44-Mutationen InsC8, InsA12, R6G, InsT23 und R6G/InsT23 phänotypisch charakterisiert werden.

Die Generierung rekombinanter HCMV-Stämme mit definierten Punktmutationen erfolgte durch *en-passant*-Mutagenese (Tischer et al.; 2010, 2006). Mit dieser Methode wurden die gewünschten Mutationen in ein HCMV-Referenzgenom eingebracht. Dieses lag als *bacterial artificial chromosome* (BAC) in *E.coli* GS1783 vor. Die Mutagenese mit Rekonstitution rekombinantem Virus in Zellkultur war für die UL27-Mutationen A20D, A184V und A558D, sowie für die UL97-Mutationen P468Q und A619V erfolgreich.

In Bezug auf die Wachstumskinetik zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den generierten Mutanten zum Referenzstamm. Zur phänotypischen Resistenztestung wurde ein Co-Kultur Plaque-Reduktionsassay verwendet. Die UL97-Mutationen P468Q und A619V zeigten sich suszeptibel gegenüber GCV (Fischer et al.; 2016). Die UL27-Mutationen A20D, A184V und A558D zeigten sich sensitiv gegenüber GCV, CDV und PFA. Somit sind die in dieser Arbeit charakterisierten Mutationen in klinischen HCMV-Isolaten als Polymorphismen einzustufen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Alvisi, G., Jans, D. A., Guo, J., Pinna, L. A. and Ripalti, A. (2005). A protein kinase CK2 site flanking the nuclear targeting signal enhances nuclear transport of human cytomegalovirus ppUL44, *Traffic* **6**(11): 1002–1013.
- Alwine, J. C. (2012). The human cytomegalovirus assembly compartment: a masterpiece of viral manipulation of cellular processes that facilitates assembly and egress, *PLoS Pathog.* **8**(9): e1002878.
- Anders, D. G. and Gibson, W. (1988). Location, transcript analysis, and partial nucleotide sequence of the cytomegalovirus gene encoding an early DNA-binding protein with similarities to ICP8 of herpes simplex virus type 1., *J. Virol.* **62**(4): 1364–1372.
- Appleton, B. A., Loregian, A., Filman, D. J., Coen, D. M. and Hogle, J. M. (2004). The cytomegalovirus DNA polymerase subunit UL44 forms a C clamp-shaped dimer, *Mol. Cell* **15**(2): 233–244.
- Baldick, C. and Shenk, T. (1996). Proteins associated with purified human cytomegalovirus particles., *J. Virol.* **70**(9): 6097–6105.
- Bigley, T. M., Reitsma, J. M. and Terhune, S. S. (2015). Antagonistic Relationship between Human Cytomegalovirus pUL27 and pUL97 Activities during Infection, *J. Virol.* **89**(20): 10230–10246.
- Biron, K. K., Harvey, R. J., Chamberlain, S. C., Good, S. S., Smith, A. A., Davis, M. G., Talarico, C. L., Miller, W. H., Ferris, R., Dornsife, R. E., Stanat, S. C., Drach, J. C., Townsend, L. B. and Kozzalka, G. W. (2002). Potent and selective inhibition of human cytomegalovirus replication by 1263w94, a benzimidazole L-riboside with a unique mode of action, *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**(8): 2365–2372.
- Bonatti, H., Sifri, C. D., Larcher, C., Schneeberger, S., Kotton, C. and Geltner, C. (2017). Use of Cidofovir for Cytomegalovirus Disease Refractory to Ganciclovir in Solid Organ Recipients, *Surg. Infect. (Larchmt)* **18**(2): 128–136.

- Boppana, S. B. and Fowler, K. B. (2007). Persistence in the population: epidemiology and transmission. In: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, et al., editors. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge University Press; 2007. Chapter 44. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK47450/> [Zugriff 20.08.2017].
- Borst, E.-M., Hahn, G., Koszinowski, U. H. and Messerle, M. (1999). Cloning of the human cytomegalovirus (HCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*: a new approach for construction of HCMV mutants, *J. Virol.* **73**(10): 8320–8329.
- Boutolleau, D., Deback, C., Bressollette-Bodin, C., Conan, F., Ait-Arkoub, Z., Imbert-Marcille, B. M. and Agut, H. (2009). Genetic analysis and putative role in resistance to antivirals of the human cytomegalovirus DNA polymerase UL44 processivity factor, *Antivir. Ther.* **14**(6): 847–852.
- Britt, W. (2015). Controversies in the natural history of congenital human cytomegalovirus infection: the paradox of infection and disease in offspring of women with immunity prior to pregnancy, *Med. Microbiol. Immunol.* **204**(3): 263–271.
- Buonsenso, D., Serranti, D., Gargiullo, L., Ceccarelli, M., Ranno, O. and Valentini, P. (2012). Congenital cytomegalovirus infection: current strategies and future perspectives, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **16**(7): 919–935.
- Chee, M. and Barrell, B. (1990). Herpesviruses: a study of parts, *Trends Genet.* **6**: 86–91.
- Chou, S. (1999). Antiviral drug resistance in human cytomegalovirus, *Transpl. Infect. Dis.* **1**(2): 105–114.
- Chou, S. (2008). Cytomegalovirus UL97 mutations in the era of ganciclovir and maribavir, *Rev. Med. Virol.* **18**(4): 233–246.
- Chou, S. (2010). Recombinant phenotyping of cytomegalovirus UL97 kinase sequence variants for ganciclovir resistance, *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**(6): 2371–2378.

- Chou, S., Guentzel, S., Michels, K. R., Miner, R. C. and Drew, W. L. (1995). Frequency of UL97 phosphotransferase mutations related to ganciclovir resistance in clinical cytomegalovirus isolates, *J. Infect. Dis.* **172**(1): 239–242.
- Chou, S., Hakki, M. and Villano, S. (2012). Effects on maribavir susceptibility of cytomegalovirus UL97 kinase ATP binding region mutations detected after drug exposure in vitro and in vivo, *Antiviral Res.* **95**(2): 88–92.
- Chou, S., Marousek, G. I., Senters, A. E., Davis, M. G. and Biron, K. K. (2004). Mutations in the human cytomegalovirus UL27 gene that confer resistance to maribavir, *J. Virol.* **78**(13): 7124–7130.
- Chou, S., Marousek, G., Li, S. and Weinberg, A. (2008). Contrasting drug resistance phenotypes resulting from cytomegalovirus DNA polymerase mutations at the same exonuclease locus, *J. Clin. Virol.* **43**(1): 107–109.
- Chou, S., Van Wechel, L. C., Lichy, H. M. and Marousek, G. I. (2005). Phenotyping of cytomegalovirus drug resistance mutations by using recombinant viruses incorporating a reporter gene, *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**(7): 2710–2715.
- Das, S. and Pellett, P. E. (2007). Members of the HCMV US12 family of predicted heptaspanning membrane proteins have unique intracellular distributions, including association with the cytoplasmic virion assembly complex, *Virology* **361**(2): 263–273.
- Das, S. and Pellett, P. E. (2011). Spatial relationships between markers for secretory and endosomal machinery in human cytomegalovirus-infected cells versus those in uninfected cells, *J. Virol.* **85**(12): 5864–5879.
- Das, S., Vasanji, A. and Pellett, P. E. (2007). Three-dimensional structure of the human cytomegalovirus cytoplasmic virion assembly complex includes a reoriented secretory apparatus, *J. Virol.* **81**(21): 11861–11869.
- Drouot, E., Piret, J. and Boivin, G. (2013). Novel method based on “en passant” mutagenesis coupled with a gaussia luciferase reporter assay for studying the combined effects of human cytomegalovirus mutations, *J. Clin. Microbiol.* **51**(10): 3216–3224.

- Eckle, T., Prix, L., Jahn, G., Klingebiel, T., Handgretinger, R., Selle, B. and Hamprecht, K. (2000). Drug-resistant human cytomegalovirus infection in children after allogeneic stem cell transplantation may have different clinical outcomes, *Blood* **96**(9): 3286–3289.
- Erice, A. (1999). Resistance of human cytomegalovirus to antiviral drugs, *Clin. Microbiol. Rev.* **12**(2): 286–297.
- Fischer, L. (2015). *Recombinant Phenotyping of Herpesviruses – Marker Transfer Analysis of newly detected HCMV Phosphotransferase- and Polymerase-Mutations and cloning of HSV-1 Strain KOS as a Bacterial Artificial Chromosome*, PhD thesis, Eberhard Karls Universität Tübingen.
- Fischer, L., Imrich, E., Sampaio, K. L., Hofmann, J., Jahn, G., Hamprecht, K. and Göhring, K. (2016). Identification of resistance-associated HCMV UL97-and UL54-mutations and a UL97-polymorphism with impact on phenotypic drug-resistance, *Antiviral Res.* **131**: 1–8.
- Gardner, T. J. and Tortorella, D. (2016). Virion Glycoprotein-Mediated Immune Evasion by Human Cytomegalovirus: a Sticky Virus Makes a Slick Getaway, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **80**(3): 663–677.
- Gilbert, C. and Boivin, G. (2005). Human cytomegalovirus resistance to antiviral drugs, *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**(3): 873–883.
- Göhring, K., Dietz, K., Hartleif, S., Jahn, G. and Hamprecht, K. (2010). Influence of different extraction methods and PCR techniques on the sensitivity of HCMV-DNA detection in dried blood spot (DBS) filter cards, *J. Clin. Virol.* **48**(4): 278–281.
- Göhring, K., Wolf, D., Bethge, W., Mikeler, E., Faul, C., Vogel, W., Vöhringer, M. C., Jahn, G. and Hamprecht, K. (2013). Dynamics of coexisting HCMV-UL97 and UL54 drug-resistance associated mutations in patients after haematopoietic cell transplantation, *J. Clin. Virol.* **57**(1): 43–49.
- Goodrum, F., Jordan, C. T., Terhune, S. S., High, K. and Shenk, T. (2004). Differential outcomes of human cytomegalovirus infection in primitive hematopoietic cell subpopulations, *Blood* **104**(3): 687–695.

- Griffiths, P., Baraniak, I. and Reeves, M. (2015). The pathogenesis of human cytomegalovirus, *J. Pathol.* **235**(2): 288–297.
- Hakki, M. and Chou, S. (2011). The biology of cytomegalovirus drug resistance, *Curr. opin. Infect. Dis.* **24**(6): 605.
- Hakki, M., Drummond, C., Houser, B., Marousek, G. and Chou, S. (2011). Resistance to maribavir is associated with the exclusion of pUL27 from nucleoli during human cytomegalovirus infection, *Antiviral Res.* **92**(2): 313–318.
- Hamprecht, K., Maschmann, J., Vochem, M., Dietz, K., Speer, C. P. and Jahn, G. (2001). Epidemiology of transmission of cytomegalovirus from mother to preterm infant by breastfeeding, *Lancet* **357**(9255): 513–518.
- Hamprecht, K., Vochem, M., Baumeister, A., Boniek, M., Speer, C. P. and Jahn, G. (1998). Detection of cytomegaloviral DNA in human milk cells and cell free milk whey by nested PCR, *J. Virol. Methods* **70**(2): 167–176.
- Hecker, M., Qiu, D., Marquardt, K., Bein, G. and Hackstein, H. (2004). Continuous cytomegalovirus seroconversion in a large group of healthy blood donors, *Vox Sang.* **86**(1): 41–44.
- Ho, M. (2008). The history of cytomegalovirus and its diseases, *Med. Microbiol. Immunol.* **197**(2): 65–73.
- Jahn, G., Scholl, B.-C., Traupe, B. and Fleckenstein, B. (1987). The two major structural phosphoproteins (pp65 and pp150) of human cytomegalovirus and their antigenic properties, *J. Gen. Virol.* **68**(5): 1327–1337.
- Jahn, G., Stenglein, S., Riegler, S., Einsele, H. and Sinzger, C. (1999). Human cytomegalovirus infection of immature dendritic cells and macrophages, *Intervirology* **42**(5-6): 365–372.
- Komatsu, T. E., Pikiş, A., Naeger, L. K. and Harrington, P. R. (2014). Resistance of human cytomegalovirus to ganciclovir/valganciclovir: a comprehensive review of putative resistance pathways, *Antiviral Res.* **101**: 12–25.

- Komazin, G., Ptak, R. G., Emmer, B. T., Townsend, L. B. and Drach, J. C. (2003). Resistance of human cytomegalovirus to the benzimidazole L-ribonucleoside maribavir maps to UL27, *J. Virol.* **77**(21): 11499–11506.
- Komazin-Meredith, G., Petrella, R. J., Santos, W. L., Filman, D. J., Hogle, J. M., Verdine, G. L., Karplus, M. and Coen, D. M. (2008). The human cytomegalovirus UL44 C clamp wraps around DNA, *Structure* **16**(8): 1214–1225. Document S1. Four Tables, Supplemental Results, and Supplemental References.
- Krosky, P. M., Baek, M.-C., Jahng, W. J., Barrera, I., Harvey, R. J., Biron, K. K., Coen, D. M. and Sethna, P. B. (2003). The human cytomegalovirus UL44 protein is a substrate for the UL97 protein kinase, *J. Virol.* **77**(14): 7720–7727.
- Liu, F. and Zhou, Z. H. (2007). Comparative virion structures of human herpesviruses. In: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, et al., editors. Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis. Cambridge: Cambridge University Press; 2007. Chapter 3. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK47399/> [Zugriff 02.09.2017].
- Loregian, A., Appleton, B. A., Hogle, J. M. and Coen, D. M. (2004). Specific residues in the connector loop of the human cytomegalovirus DNA polymerase accessory protein UL44 are crucial for interaction with the UL54 catalytic subunit, *J. Virol.* **78**(17): 9084–9092.
- Lurain, N. S. and Chou, S. (2010). Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus, *Clin. Microbiol. Rev.* **23**(4): 689–712.
- Mahy, B. W. J. and Kangro, H. O. (1996). *Virology Methods Manual*, Academic Press, San Diego.
- Marschall, M., Feichtinger, S. and Milbradt, J. (2011). Regulatory roles of protein kinases in cytomegalovirus replication, *Adv. Virus Res.* **80**: 69.
- Marschall, M., Freitag, M., Suchy, P., Romaker, D., Kupfer, R., Hanke, M. and Stamminger, T. (2003). The protein kinase pUL97 of human cytomegalovirus interacts with and phosphorylates the DNA polymerase processivity factor pUL44, *Virology* **311**(1): 60–71.

- Marty, F. M., Ljungman, P., Papanicolaou, G. A., Winston, D. J., Chemaly, R. F., Strasfeld, L., Young, J.-A. H., Rodriguez, T., Maertens, J., Schmitt, M., Einsele, H., Ferrant, A., Lipton, J. H., Villano, S. A., Chen, H. and Boeckh, M. M. .-. C. S. G. (2011). Maribavir prophylaxis for prevention of cytomegalovirus disease in recipients of allogeneic stem-cell transplants: a phase 3, double-blind, placebo-controlled, randomised trial, *Lancet Infect. Dis.* **11**(4): 284–292.
- Maschmann, J., Hamprecht, K., Dietz, K., Jahn, G. and Speer, C. (2001). Cytomegalovirus infection of extremely low—birth weight infants via breast milk, *Clin. Infect. Dis.* **33**(12): 1998–2003.
- Melnik, L. I., Garry, R. F. and Morris, C. A. (2011). Peptide inhibition of human cytomegalovirus infection, *Virology* **8**(1): 76.
- Milbradt, J., Kraut, A., Hutterer, C., Sonntag, E., Schmeiser, C., Ferro, M., Wagner, S., Lenac, T., Claus, C., Pinkert, S., Hamilton, S. T., Rawlinson, W. D., Sticht, H., Couté, Y. and Marschall, M. (2014). Proteomic analysis of the multimeric nuclear egress complex of human cytomegalovirus, *Mol. Cell. Proteomics* **13**(8): 2132–2146.
- Mocarski, E. S. (2002). Immunomodulation by cytomegaloviruses: manipulative strategies beyond evasion, *Trends Microbiol.* **10**(7): 332–339.
- Patel, R. and Paya, C. V. (1997). Infections in solid-organ transplant recipients, *Clin. Microbiol. Rev.* **10**(1): 86–124.
- Prichard, M. N., Gao, N., Jairath, S., Mulamba, G., Krosky, P., Coen, D. M., Parker, B. O. and Pari, G. S. (1999). A recombinant human cytomegalovirus with a large deletion in UL97 has a severe replication deficiency, *J. Virol.* **73**(7): 5663–5670.
- Prichard, M. N., Quenelle, D. C., Bidanset, D. J., Komazin, G., Chou, S., Drach, J. C. and Kern, E. R. (2006). Human cytomegalovirus UL27 is not required for viral replication in human tissue implanted in SCID mice, *Virology* **3**: 18.
- Prix, L., Hamprecht, K., Holzhüter, B., Handgretinger, R., Klingebiel, T. and Jahn, G. (1999). Comprehensive restriction analysis of the UL97 region allows early detection of ganciclovir-resistant human cytomegalovirus in an immunocompromised child, *J. Infect. Dis.* **180**(2): 491–495.

- Prix, L., Maierl, J., Jahn, G. and Hamprecht, K. (1998). A simplified assay for screening of drug resistance of cell-associated cytomegalovirus strains, *J. Clin. Virol.* **11**(1): 29–37.
- Reddehase, M. J. (2002). Antigens and immunoevasins: opponents in cytomegalovirus immune surveillance, *Nat. Rev. Immunol.* **2**(11): 831–844.
- Reitsma, J. M., Savaryn, J. P., Faust, K., Sato, H., Halligan, B. D. and Terhune, S. S. (2011). Antiviral inhibition targeting the HCMV kinase pUL97 requires pUL27-dependent degradation of Tip60 acetyltransferase and cell-cycle arrest, *Cell Host Microbe* **9**(2): 103–114.
- Ribbert, H. (1904). Über protozoenartige Zellen in der Niere eines syphilitischen Neugeborenen und in der Parotis von Kindern, *Zentralbl. Allg. Pathol.* **15**(15): 945–8.
- Sampaio, K. L., Cavignac, Y., Stierhof, Y. D. and Sinzger, C. (2005). Human cytomegalovirus labeled with green fluorescent protein for live analysis of intracellular particle movements, *J. Virol.* **79**(5): 2754–2767.
- Sanchez, V., Greis, K. D., Sztul, E. and Britt, W. J. (2000). Accumulation of virion tegument and envelope proteins in a stable cytoplasmic compartment during human cytomegalovirus replication: characterization of a potential site of virus assembly, *J. Virol.* **74**(2): 975–986.
- Sanchez, V., Sztul, E. and Britt, W. J. (2000). Human cytomegalovirus pp28 (UL99) localizes to a cytoplasmic compartment which overlaps the endoplasmic reticulum-golgi-intermediate compartment, *J. Virol.* **74**(8): 3842–3851.
- Schreiber, A., Härter, G., Schubert, A., Bunjes, D., Mertens, T. and Michel, D. (2009). Antiviral treatment of cytomegalovirus infection and resistant strains, *Expert Opin. Pharmacother.* **10**(2): 191–209.
- Shi, R., Azzi, A., Gilbert, C., Boivin, G. and Lin, S.-X. (2006). Three-dimensional modeling of cytomegalovirus DNA polymerase and preliminary analysis of drug resistance, *Proteins* **64**(2): 301–307.

- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Soding, J., Thompson, J. D. and Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega, *Molecular Systems Biology* **7**(1): 539–539.
- Sinclair, J. and Sissons, P. (2006). Latency and reactivation of human cytomegalovirus, *J. Gen. Virol.* **87**(7): 1763–1779.
- Sinigalia, E., Alvisi, G., Mercorelli, B., Coen, D. M., Pari, G. S., Jans, D. A., Ripalti, A., Palù, G. and Loregian, A. (2008). Role of homodimerization of human cytomegalovirus DNA polymerase accessory protein UL44 in origin-dependent DNA replication in cells, *J. Virol.* **82**(24): 12574–12579.
- Sinzger, C., Hahn, G., Digel, M., Katona, R., Sampaio, K. L., Messerle, M., Hengel, H., Koszinowski, U., Brune, W. and Adler, B. (2008). Cloning and sequencing of a highly productive, endotheliotropic virus strain derived from human cytomegalovirus TB40/E, *J. Gen. Virol.* **89**(Pt 2): 359–368.
- Sissons, J. P. and Wills, M. R. (2015). How understanding immunology contributes to managing CMV disease in immunosuppressed patients: now and in future, *Med. Microbiol. Immunol.* **204**(3): 307–316.
- Smith, M. G. (1956). Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **92**(2): 424–430.
- Spector, D. H. (2015). Human cytomegalovirus riding the cell cycle, *Med. Microbiol. Immunol.* **204**(3): 409–419.
- Tandon, R. and Mocarski, E. S. (2012). Viral and host control of cytomegalovirus maturation, *Trends Microbiol.* **20**(8): 392–401.
- Taylor, G. H. (2003). Cytomegalovirus, *Am. Fam. Physician* **67**(3): 519–524.
- Tischer, B. K. and Kaufer, B. B. (2012). Viral bacterial artificial chromosomes: generation, mutagenesis, and removal of mini-F sequences, *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**.

- Tischer, B. K., Smith, G. A. and Osterrieder, N. (2010). En passant mutagenesis: a two step markerless red recombination system, *Methods Mol. Biol.* **634**: 421–430.
- Tischer, B. K., von Einem, J., Kaufer, B. and Osterrieder, N. (2006). Two-step red-mediated recombination for versatile high-efficiency markerless DNA manipulation in *Escherichia coli*, *Biotechniques* **40**(2): 191–197.
- Trofe, J., Pote, L., Wade, E., Blumberg, E. and Bloom, R. D. (2008). Maribavir: a novel antiviral agent with activity against cytomegalovirus, *Ann. Pharmacother.* **42**(10): 1447–1457.
- Varnum, S. M., Streblow, D. N., Monroe, M. E., Smith, P., Auberry, K. J., Pasa-Tolic, L., Wang, D., Camp, D. G., Rodland, K., Wiley, S., Britt, W., Shenk, T., Smith, R. D. and Nelson, J. A. (2004). Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome, *J. Virol.* **78**(20): 10960–10966.
- Wallace, P. R., Janet, W. H., Samuel, W., Horace, C. T. and Robert, J. H. (1956). Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **92**(2): 418–424.
- Wathen, M., Thomsen, D. and Stinski, M. (1981). Temporal regulation of human cytomegalovirus transcription at immediate early and early times after infection., *J. Virol.* **38**(2): 446–459.
- Weiland, K. L., Oien, N. L., Homa, F. and Wathen, M. W. (1994). Functional analysis of human cytomegalovirus polymerase accessory protein, *Virus Res.* **34**(3): 191–206.
- Weller, T. H. (1953). Serial propagation in vitro of agents producing inclusion bodies derived from varicella and herpes zoster, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **83**(2): 340–346.
- Wilkinson, G. W., Davison, A. J., Tomasec, P., Fielding, C. A., Aicheler, R., Murrell, I., Seirafian, S., Wang, E. C., Weekes, M., Lehner, P. J., Wilkie, G. S. and Stanton, R. J. (2015). Human cytomegalovirus: taking the strain, *Med. Microbiol. Immunol.* **204**(3): 273–284.
- Wolf, D. G., Courcelle, C. T., Prichard, M. N. and Mocarski, E. S. (2001). Distinct and separate roles for herpesvirus-conserved UL97 kinase in cytomegalovirus DNA synthesis and encapsidation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **98**(4): 1895–1900.

Woon, H.-G., Scott, G. M., Yiu, K. L., Miles, D. H. and Rawlinson, W. D. (2008). Identification of putative functional motifs in viral proteins essential for human cytomegalovirus DNA replication, *Virus Genes* **37**(2): 193–202.

# 7 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationschrift

Die Arbeit wurde am Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten, Tübingen unter Betreuung von Herr Prof. Dr. Gerhard Jahn durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Frau Dr. Katharina Göhring, AG-Leiterin und Fachvirologin.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Frau Dr. Lena Fischer von mir eigenständig durchgeführt. Die Charakterisierung der UL97-Mutanten P468Q und A619V erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Lena Fischer.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Frau Dr. Katharina Göhring und Frau Dr. Lena Fischer durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

## 8 Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

Fischer, L., Imrich, E., Sampaio, K.L., Hofmann, J., Jahn, G., Hamprecht, K. & Göhring, K. (2016). Identification of Resistance-associated HCMV UL97- and UL54-Mutations and a UL97-Polymorphism with Impact on Phenotypic Drug-Resistance. *Antiviral Research*, 131:1-8.

### **Vortrag**

Eike Imrich, Lena Fischer, Gerhard Jahn, Klaus Hamprecht, Katharina Göhring.  
Identification and Generation of HCMV UL27- and UL44-Mutants with Subsequent Characterization in Regard to Resistance to Antiviral Agents  
17th Annual Meeting of the European Society of Clinical Virology, Clarion Congress Hotel Prague, Prague, Czech Republic, September 28th - October 1st 2014

### **Posterpräsentation**

Eike Imrich, Lena Fischer, Gerhard Jahn, Klaus Hamprecht, Katharina Göhring.  
Generation and characterization of defined HCMV UL44- and UL27-mutants with regard to resistance to antiviral therapy.  
24th Annual Meeting of the Society for Virology, Congress Alpbach, Tyrol, Austria, March 26th-29th 2014

## Danksagung

Ich möchte mich herzlichst bei allen Bedanken, die mich während dieser Arbeit unterstützt und zum Gelingen beigetragen haben.

Bei Herrn Prof. Dr. Gerhard Jahn möchte ich mich für die Ermöglichung der Kongressbesuche, der unkomplizierten Zusammenarbeit und der guten Betreuung bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Katharina Göhring und Frau Dr. Lena Fischer. Frau Dr. Katharina Göhring gilt mein Dank für die ausgezeichnete Betreuung und die Möglichkeit, jederzeit mit Fragen zu ihr kommen zu können. Bei Frau Dr. Lena Fischer möchte ich mich für die sehr gute Einarbeitung und die vielen Ratschläge bedanken. Ein großes Dankeschön an beide für die ausgezeichnete Arbeitsatmosphäre und die tolle Zeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei Irina Krotova für die stete Unterstützung mit Reagenzien und die freundliche Atmosphäre im Labor.

Bei Prof. Dr. Marlies Knipper und Dr. Inka Montero möchte ich mich für die engagierte Betreuung des IZKF-Promotionskollegs bedanken.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern des Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten für die freundliche Aufnahme.

# Curriculum Vitae

Name: Eike Christian Imrich  
Geburtsdatum: 13. Juli 1990  
Geburtsort: Würzburg  
Nationalität: deutsch

## *Ausbildung*

09/2013 - 09/2017      Dissertation, Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten, Tübingen  
14.07.2017              Approbation als Arzt, Regierungspräsidium Stuttgart  
20.06.2017              Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Tübingen  
04/2010 - 06/2017      Studium der Humanmedizin, Eberhard Karls Universität, Tübingen  
2004 - 06/2009        Allgemeine Hochschulreife, Max-Planck-Schule, Groß-Umstadt