

Aus dem Departement der Diagnostischen Labormedizin der  
Universität Tübingen  
Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie der  
Viruskrankheiten

**Funktionelle Analyse von rekombinanten Cytomegalovirus-  
Stämmen mit Punktmutationen im UL54 und UL97 Gen sowie  
kombinierten UL54 / UL97 Mutationen**

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

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

**Vorgelegt von**

**Krümpelmann, Hannah Barbara**

**2021**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. K. Hamprecht

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Ebinger

Tag der Disputation: 02.12.2021

## Abkürzungsverzeichnis

AC	Assembly Complex
ACV	Aciclovir
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
ARPE-19	Humane retinale Pigmentepithelzellen
ART	Artesunat
BAC	Bakterielles artifizielles Chromosom
bp	Basenpaare
CDV	Cidofovir
CMV-IVIG	Cytomegalovirus i.v. Immunglobulin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Phosphatgepufferte Saline
E	Early
EBV	Ebstein-Barr-Virus
EC <sub>50</sub>	Effective Concentration 50
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
FCS	Fetales Kälberserum
FDA	Food and Drug Administration
FOS	Foscarnet
gB	Glykoprotein B
GCV	Ganciclovir
HCMV	Humanes Cytomegalievirus
HFF	Humane Vorhautfibroblasten
HHV	Humanes Herpesvirus
HSV	Herpes Simplex Virus
IE	Immediate Early
IR <sub>L</sub>	Internal Repeat Long
IR <sub>s</sub>	Internal Repeat Short
kbp	Kilobasenpaare
KSHV	Kaposi-Sarkom-Herpesvirus
L	Late
LEF	Leflunomid

MEM	Minimal Essential Medium
MBV	Maribavir
MOI	Multiplicity of Infection
MRP1	Multidrug Resistance Protein 1
ORF	Open Reading Frame
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGFR $\alpha$	Platelet Derived Growth Factor Receptor A
RNA	Ribonukleinsäure
R <sub>L</sub>	Repeat Long
rpm	Runden pro Minute
R <sub>s</sub>	Repeat Short
TCID <sub>50</sub>	Tissue Culture Infective Dose 50
TR <sub>L</sub>	Terminal Repeat Long
TR <sub>s</sub>	Terminal Repeat Short
U <sub>L</sub>	Unique Long
U <sub>s</sub>	Unique Short
V-GCV	Valganciclovir
VZV	Varizella-Zoster-Virus

# Inhaltverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Klassifizierung der Herpesviren	1
1.2	Das humane Cytomegalievirus	2
1.3	Virusaufbau	4
1.4	Genom	5
1.5	Replikationszyklus	6
1.6	Übertragungswege	9
1.7	Klinische Symptomatik	9
1.7.1	Immunkompetente Patienten	9
1.7.2	Immunsupprimierte Patienten	10
1.7.3	Infektion während der Schwangerschaft	11
1.7.4	Latenz	12
1.8	Zielstrukturen antiviraler Substanzen	14
1.8.1	UL54	14
1.8.2	UL97	15
1.8.3	Terminasekomplex	16
1.9	Antivirale Substanzen	17
1.9.1	Ganciclovir / Valganciclovir	17
1.9.2	Cidofovir	18
1.9.3	Foscarnet	19
1.9.4	Maribavir	19
1.9.5	Letermovir (AIC246)	20
1.10	Antivirale Resistenzen	20
1.11	Impfung	22
1.12	Zielsetzung der Arbeit	23

2	Material und Methoden	25
2.1	Material	25
2.1.1	HCMV-Mutationen	25
2.1.2	Zellen	26
2.1.3	Bakterien	27
2.1.4	BACs	27
2.1.5	Medien für die Zellkultur	28
2.1.6	Virostatika	29
2.1.7	Medien für die Bakterienkultur	29
2.1.8	Reagenzien für die PCR	29
2.1.9	Primer für die Mutagenese-PCR und Sequenzierungsprimer	30
2.1.10	Reagenzien für die Gelelektrophorese	32
2.1.11	Reagenzien für den DNA-Verdau	32
2.1.12	Reagenzien für Immunfluoreszenz	32
2.1.13	Verbrauchsmaterial	33
2.1.14	Kits	34
2.1.15	Kleingeräte	34
2.1.16	Großgeräte	34
2.1.17	Computerprogramme	35
2.2	Methoden	36
2.2.1	Übersicht	36
2.2.2	Generierung von PCR-Produkten mit definierten Punktmutationen	36
2.2.3	Gelelektrophorese, um den Erfolg der Mutagenese-PCR zu bestätigen	39
2.2.4	PCR-Aufreinigung und DpnI-Verdau, um die übrig gebliebenen Templates zu entfernen	40

2.2.5	Generierung elektrokompetenter <i>E. coli</i> GS1783 und BAC-Mutagenese	41
2.2.6	Entfernung des positiven Selektionsmarkers (Kanamycinresistenzgen)	42
2.2.7	Minipräparation der BAC-DNA zur späteren Erfolgskontrolle	44
2.2.8	Kontrolle der erfolgreichen Mutagenese durch Sequenzierung des UL54- und des UL97-Gens	45
2.2.9	Midipräparation, um rekombinantes zirkuläres HCMV-Genom für die Transfektion zu erhalten	46
2.2.10	Zellkultur humaner Vorhautfibroblasten und humaner retinaler Pigmentepithelzellen	47
2.2.11	Transfektion der Bacmid-DNA in HFF	48
2.2.12	Sequenzierung des Virenüberstands	49
2.2.13	Bestimmung des Virustiters durch Bestimmung der Multiplicity of Infection (MOI) und TCID <sub>50</sub> -Assay (Tissue Culture Infective Dose)	50
2.2.14	Phänotypische Charakterisierung der rekombinanten HCMV-Stämme mittels Wachstumsversuchen	52
2.2.15	Phänotypische Charakterisierung der rekombinanten HCMV-Stämme durch Plaque-Reduktions-Assays	53
3	Ergebnisse	56
3.1	Generierung von PCR-Produkten mit definierten Punktmutationen	56
3.2	BAC-Mutagenese und Sequenzierung der entsprechenden Region in UL54 und UL97	57
3.3	Transfektion der Bacmid-DNA in HFF	58
3.4	Sequenzierung des Virusüberstands, um das Vorhandensein der gewünschten Punktmutationen zu beweisen und das Auftreten von unerwünschten Basenpaarveränderungen zu widerlegen	60

3.5	Phänotypische Charakterisierung der rekombinanten HCMV-Stämme über Wachstumsversuche	60
3.6	Phänotypische Charakterisierung der rekombinanten HCMV-Stämme durch Plaque-Reduktions-Assays	63
4	Diskussion	69
4.1	Generierung von rekombinantem HCMV mit definierten Punktmutationen über die en-passant Mutagenese	69
4.2	Phänotypische Charakterisierung von rekombinanten HCMV-Mutationen mit definierten Punktmutationen durch Wachstums-Assays	71
4.3	Phänotypische Charakterisierung von rekombinanten HCMV-Mutationen durch Plaque-Reduktions-Assays	73
5	Zusammenfassung	76
6	Literaturverzeichnis	78
7	Appendix	88
7.1	Appendix 1	88
7.2	Appendix 2	92
	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift	95
	Danksagung	96

# 1 Einleitung

## 1.1 Klassifizierung der Herpesviren

Das Wort Herpes leitet sich von dem griechischen Wort *herpein* ab, welches auf Deutsch übersetzt „kriechen“ bedeutet. Damit werden die sich ausbreitenden Hautläsionen, wie man sie bei HSV1, HSV2 und Herpes Zoster finden kann (Beswick, 1962), beschrieben. Allen Herpesviren ist gemein, dass sich eine 125-290 kbp lange, lineare doppelsträngige DNA in einem ikosaedrischen Kapsid befindet. Dieses Kapsid ist von einem proteinhaltigen Tegument umgeben, welches wiederum von einer Lipiddoppelschicht umgeben ist (Davison, 2007). Die neuen Kapside werden im Kern der Wirtszelle gebildet, dadurch entstehen die klassischen, mikroskopisch sichtbaren nukleären Einschlusskörperchen (zu sehen in Abschnitt 1.2 Abbildung 1) (Sodeik et al., 2016).

Herpesviren haben die Fähigkeit, lebenslang zu persistieren und aus der Latenz durch gewisse interne und externe Stimuli wieder zu reaktivieren (Sodeik et al., 2016). Dies bedingt den allen Herpesviren gemeinen bipartiten Lebenszyklus, bei dem latente und lytische Stadien durchlaufen werden (Cruz-Munoz and Fuentes-Panana, 2017).

Die Ordnung der Herpesvirales lässt sich in die drei Familien Alloherpesviridae, Herpesviridae und Malacoviridae unterteilen. Über 130 verschiedene Herpesviren wurden bis jetzt klassifiziert, davon bis zum jetzigen Zeitpunkt neun humanpathogene. Basierend auf biologischen Eigenschaften wie Wachstumsverhalten und Gewebetropismus lassen sich die Herpesviren in verschiedene Subfamilien unterteilen. Die humanpathogene Familie der Herpesviridae gliedert sich in die drei Subfamilien  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  (Liu and Zhou, 2007). In der  $\alpha$ -Subfamilie befinden sich die neurotrophen Herpesviren Herpes-Simplex-Virus Typ 1 (HSV-1) und Typ 2 (HSV-2) und das Varizella-Zoster-Virus (VZV). Die Gruppe der  $\beta$ -Herpesviren kann verschiedene Gewebe und Zellen befallen und beinhaltet das humane Cytomegalievirus (HCMV), das humane Herpesvirus 6-A (HHV6-A) und -B (HHV6-B) sowie das humane Herpesvirus 7

(HHV7). In der  $\gamma$ -Gruppe sind die lymphotropen Herpesviren Epstein-Barr-Virus (EBV) und das humane Herpesvirus 8 (HHV8), auch Kaposi-Sarkom-Herpesvirus (KSHV) genannt.

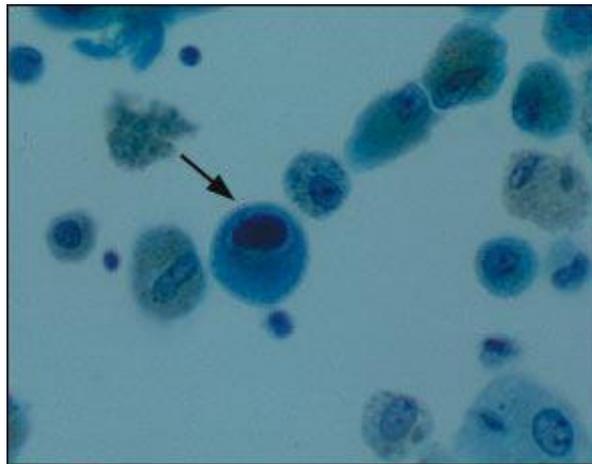
**Tabelle 1:** Übersicht über die humanpathogenen Herpesviren

Systematische Nomenklatur	Vertreter	Gruppe
HHV1	Herpes-Simplex-Virus Typ 1	Alpha-Herpesviridae
HHV2	Herpes-Simplex-Virus Typ 2	Alpha-Herpesviridae
HHV3	Varizella-Zoster-Virus	Alpha-Herpesviridae
HHV4	Epstein-Barr-Virus	Gamma-Herpesviridae
HHV5	Humanes Cytomegalievirus	Beta-Herpesviridae
HHV6-A	Humanes Herpesvirus 6A	Beta-Herpesviridae
HHV6-B	Humanes Herpesvirus 6B	Beta-Herpesviridae
HHV7	Humanes Herpesvirus 7	Beta-Herpesviridae
HHV8	Kaposi-Sarkom-Herpesvirus	Gamma-Herpesviridae

## 1.2 Das humane Cytomegalievirus

Das humane Cytomegalievirus (HCMV) gehört zu der Gruppe der  $\beta$ -Herpesviren. Es wurde erstmals 1904 von Hugo Ribbert beschrieben, nachdem dieser 1881 „Protozoen ähnliche“ Zellen in der Niere eines an Syphilis erkrankten Säuglings fand (Ribbert, 1904). Goodpasture et al. prägten 1921 den Begriff der Zytomegalie (Goodpasture and Talbot, 1921). Für das Zustandekommen des namensgebenden Effektes der Zellvergrößerung existieren verschiedene Theorien, wie zum Beispiel ein Kationeninflux, Suppression der Fibronektinsynthese oder die Herunterregulierung der Integrinsynthese (Albrecht and Weller, 1980, Warren et al., 1994, Ihara et al., 1982). Nachdem zunächst angenommen wurde, dass Protozoen für den zytopathischen Effekt verantwortlich seien, zogen 1925 von Glahn und Pappenheimer auch eine virale Ursache in Erwägung (Von Glahn and Pappenheimer, 1925). Zwischen 1955 und 1957 gelang es erstmals Margaret Smith, dann auch Thomas Weller und Rowe

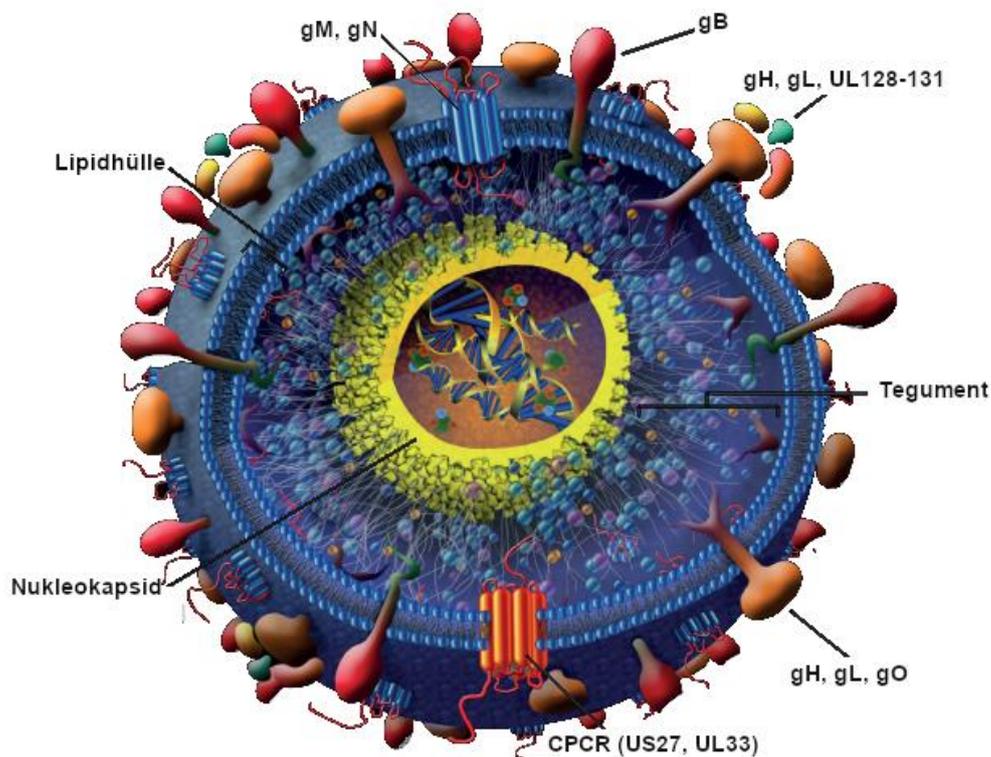
et al., das Cytomegalievirus zu isolieren (Wallace et al., 1956, Craig et al., 1957, Smith, 1956). Weller nannte das Virus Cytomegalovirus (Ho, 2008). Der einzige natürliche Wirt ist der Mensch. Durch eine lange Koevolution mit diesem entwickelten sich zusammengefasst folgende drei biologischen Hauptmerkmale: die Pathogenität von HCMV ist gering, die Transmission von Wirt zu Wirt ist relativ effizient und das Virus besitzt zahlreiche Strategien, dem Immunsystem zu entgehen (Revello et al., 2014). Nach der Primärinfektion persistiert HCMV lebenslang, aber ein funktionierendes Immunsystem ist im Stande, Reaktivierungen in Schach zu halten (Goodrum, 2016). Während eine Infektion bei Gesunden meistens asymptomatisch oder nur mit milden Symptomen abläuft, kann HCMV bei Immunsupprimierten, wie zum Beispiel bei Patienten nach Stammzelltransplantation oder Transplantation solider Organe, schwere Infektionen verursachen (El Helou and Razonable, 2019). Weiterhin ist eine Primärinfektion in der Schwangerschaft der führende Grund für schwere neurologische Schäden bei Kindern (Ludwig and Hengel, 2009).



**Abbildung 1:** klassische "Eulenzellen", die sich durch den zytopathischen Effekt der HCMV-Infektion bilden, mit den für Herpesinfektionen typischen Einschlusskörperchen (Pfeil). Abbildung mit freundlicher Genehmigung aus: Taylor et al. (Taylor, 2003).

### 1.3 Virusaufbau

Das reife HCMV Virion hat einen Durchmesser von 150-200 nm. In der Mitte liegt das ikosaedrische Kapsid mit einem Durchmesser von 100 nm, welches die 230 kbp lange, doppelsträngige lineare DNA zusammen mit den assoziierten Proteinen beinhaltet. Umgeben ist das Kapsid von einer amorphen, proteinreichen Struktur, dem sogenannten Tegument. Das Tegument von HCMV nimmt ein großes Kompartiment ein und beinhaltet etwa die Hälfte aller viralen Proteine (Varnum et al., 2004). Die enthaltenen viralen Proteine werden nach der Fusion der Virushülle mit der Zellmembran freigesetzt und kontrollieren das Eindringen in die Wirtszelle, die Immunevasion und Genexpression. Weiterhin spielen sie eine wichtige Rolle bei dem Zusammenbau und der Ausschleusung neu gebildeter Virionen aus der Wirtszelle (Kalejta, 2008a). Das am häufigsten vorkommende Protein ist hier pp65, das Genprodukt von UL83 (Varnum et al., 2004). Dieses Protein spielt in der Immunevasion eine große Rolle, außerdem ist es über den pp65-Antigen-Test von großer diagnostischer Relevanz (Abate et al., 2004). Das Tegument ist von einer Hülle aus einer Lipiddoppelschicht umgeben, welche von der Zellmembran der Wirtszelle abgeleitet wird und die von viralen Glykoproteinen durchsetzt ist. Über die Glykoproteine können die HCMV-Virionen an zelluläre Rezeptoren binden, mit der Wirtszelle fusionieren und sie sind für die Verstärkung der Zell-zu-Zell-Verbreitung verantwortlich. Viele Funktionen der Glykoproteine sind aber auch noch unbekannt (Isaacson et al., 2008).



**Abbildung 2:** die typische vierschichtige Struktur eines HCMV-Virions, bestehend aus DNA-haltigem Kern, Nukleokapsid, Tegument und Lipidhülle (Abbildung modifiziert nach Caposio et al (Caposio, 2013)).

## 1.4 Genom

HCMV hat mit 229,4 kbp das größte Genom in der Gruppe der humanen Herpesviren und kodiert für über 200 virale Proteine. Der größte Anteil der transkribierten RNA scheint aber nicht-kodierend zu sein (Wilkinson et al., 2015). Das Genom besteht aus vier Teilen: unique long und short ( $U_L$  und  $U_S$ ), welche von zwei Sets invertierter repetitiver Regionen flankiert werden ( $TR_L$  und  $IR_L$ ;  $TR_S$  und  $IR_S$ ). Die gesamte Struktur kann als  $TR_L-U_L-IR_L-IR_S-U_S-TR_S$  beschrieben werden (Weststrate et al., 1980). Durch Rekombination zwischen den invertierten Wiederholungen in der konkatemeren DNA während der DNA-Replikation kommt es zu der Bildung von Virionen, welche in gleichen Anteilen jeweils einen von vier DNA-Isomeren enthalten. Diese unterscheiden sich in der relativen Orientierung von  $U_L$  und  $U_S$  zueinander. Der Grund für die Bildung der Isomere muss noch aufgeklärt werden (Sauer et al., 2010).

Anhand ihrer Kinetik lassen sich die viralen Proteine in drei verschiedene Klassen unterteilen: IE- (englisch: Immediate-Early), E- (englisch: Early) und L- (englisch: Late) Proteine (Hones and Roizman, 1974).

Die Immediate-Early-Proteine passen die Umgebung in der Wirtszelle optimal auf die virale Replikation an und stimulieren die Expression der Early-Proteine. Die Early-Proteine sorgen für die Replikation der viralen DNA und die Late-Proteine sind einerseits Strukturkomponenten neuer Virionen und andererseits unterstützen sie den Zusammenbau und die Ausschleusung neu gebildeter Virionen (Kalejta, 2008a).

## 1.5 Replikationszyklus

Nach der Infektion repliziert HCMV an der Eintrittspforte zunächst in den Epithelzellen und breitet sich dann über das Blut in eine Vielzahl von Organen aus, wobei HCMV einen außerordentlich breiten Zelltropismus aufweist (Britt, 2007). In der Literatur wurde bis jetzt ein Tropismus für Fibroblasten, Endothelzellen, Epithelzellen, Monozyten / Makrophagen, glatte Muskelzellen, Neurone, Neutrophile Granulozyten und Hepatozyten beschrieben (Myerson et al., 1984, Ibanez et al., 1991, Sinzger et al., 2000). Dies ist auch der Grund dafür, dass sich eine HCMV-Krankheit bei Immunsupprimierten in fast allen Organsystemen und Gewebearten manifestieren kann (Isaacson et al., 2008). Im ersten Schritt des Replikationszyklus von HCMV interagieren verschiedene Glykoproteine in der Hülle der infektiösen Virionen mit unterschiedlichen Rezeptoren auf den Wirtszellen (z.B. Heparansulfat-Proteoglykane (Compton et al., 1993), PDGFR $\alpha$  (Kabanova et al., 2016, Wu et al., 2017, Stegmann et al., 2017) oder Neuropilin-2 (Martinez-Martin et al., 2018)), um durch Fusion (Fibroblasten) oder Endozytose (Epithelzellen, Endothelzellen, Makrophagen) in die Zelle zu gelangen (Isaacson et al., 2008, Feire et al., 2010, Compton et al., 1992, Sinzger, 2008). Zahlreiche weitere Rezeptoren scheinen Eintrittsrezeptoren für HCMV zu sein und der breite Zelltropismus von HCMV macht es sehr wahrscheinlich, dass noch eine Vielzahl zellulärer Rezeptoren hierbei eine wichtige Rolle spielen (Nguyen and Kamil, 2018).

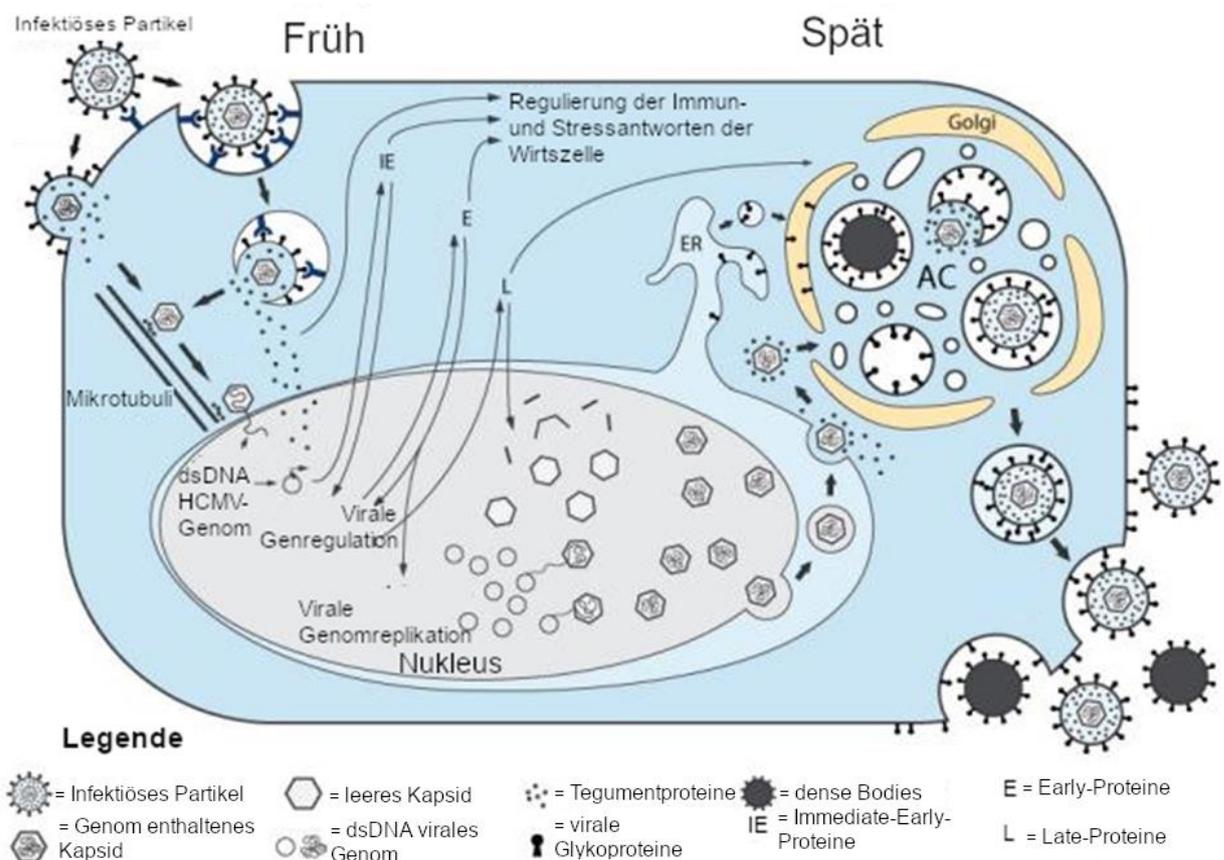
Nach der Endozytose oder Fusion der Virionen mit der Zellmembran der Wirtszelle werden virale Tegumentproteine und das Kapsid in das Zytoplasma der Wirtszelle freigesetzt (Kalejta, 2008a). Tegumentproteine, die an das virale Kapsid gebunden sind, interagieren mit dem Mikrotubulisystem der Wirtszelle, um das Kapsid in den Nukleus der Wirtszelle zu transportieren. Dort zirkularisiert die virale DNA sofort (Ogawa-Goto et al., 2003, Kalejta, 2008a). Gleichzeitig inhibieren andere Tegumentproteine die erste Immunantwort des Wirtes (Li et al., 2013). Weitere virale Proteine verändern die Signalwege in der Wirtszelle sowie den Zellmetabolismus, um optimale Bedingungen für die virale Replikation zu schaffen (Yurochko, 2008, Yu et al., 2011). Nachdem das virale Genom in dem Nukleolus der Wirtszelle angekommen ist, steuern zelluläre Faktoren wie zum Beispiel Daxx, ob entweder die Immediate-Early-Gene aktiviert und somit der lytische Zyklus initiiert wird oder ob die Immediate-Early-Gene supprimiert werden, um somit eine latente Infektion zu etablieren (Saffert and Kalejta, 2007, Kalejta, 2008b).

Der lytische Zyklus geschieht normalerweise in Zellen der Mukosa, um eine Weiterverbreitung des Virus zu ermöglichen (Cruz-Munoz and Fuentes-Panana, 2017). Eine latente Infektion erfolgt vornehmlich in Zellen des Immunsystems, nämlich den myeloiden Vorläuferzellen und Zellen der myeloiden Linie (Sinclair, 2008).

Nach Freisetzung der viralen DNA in dem Wirtszellnukleus beginnt die virale DNA-Replikation, sowie die RNA-Transkription (Tandon and Mocarski, 2012). Anschließend werden die Late-Gene aktiviert, die neu gebildete virale DNA akkumuliert im Nukleus und wird in Prokapside verpackt (Gibson, 2008). Im Zellnukleus des Wirts finden also die virale Kapsidanordnung, die virale DNA-Synthese, die Encapsidation und die initiale Tegumentation statt. All diese Schritte sind essenziell abhängig von streng konservierten viralen Proteinen. Ein aus viralen Proteinen geformter Nukleärer-Austrittskomplex transportiert die Nukleokapside in das Zytoplasma. HCMV ist nun in der Lage den sekretorischen Apparat der Wirtszelle, bestehend aus Endosomen, dem endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat für sich umzugestalten und so aus zellulären Komponenten sowie viralen Struktur- und Tegumentproteinen den viralen

Zusammensetzungskomplex AC (englisch: Assembly Complex) zu bilden (Alwine, 2012). An dem Zusammensetzungskomplex erhalten die viralen Kapside ihre Hülle aus Tegument und Lipiddoppelschicht und werden dann als infektiöse Partikel aus der Wirtszelle ausgeschleust (Jean Beltran and Cristea, 2014). Der gesamte Replikationszyklus von HCMV dauert in der Regel zwischen 48 bis 72 Stunden in vitro, in vivo scheint die Verdopplungszeit mit circa einem Tag deutlich schneller zu sein (Dong et al., 2018, Emery, 1999).

Die Übertragung auf weitere Zellen geschieht wahrscheinlich vor allem durch direkte Zell-Zell-Weiterverbreitung und nicht durch die Ausschleusung extrazellulärer infektiöser Virionen, da diese deutlich anfälliger gegenüber Antikörpern sind (Nguyen and Kamil, 2018). Besonders infizierte Endothelzellen scheinen eine wichtige Rolle zu spielen, da sich das Virus von hier aus via Makrophagen, Granulozyten oder abgeschilferten Endothelzellen überall im Körper ausbreiten kann (Sinzger et al., 2008).



**Abbildung 3:** Replikationszyklus (Abbildung modifiziert nach Beltran und Cristea (Jean Beltran and Cristea, 2014)).

## **1.6 Übertragungswege**

HCMV wird zumeist horizontal als Schmierinfektion mit infektiösen Körperflüssigkeiten wie Speichel, Nasensekret, Urin, Vaginalsekret, Brustmilch oder Sperma übertragen (Britt, 2007, Boppana and Fowler, 2007). Hauptüberträger sind seropositive Kinder, die häufig jahrelang unbemerkt infektiöse Viren ausscheiden können (Britt, 2007). Aber auch die vertikale Infektion spielt eine äußerst wichtige Rolle und erfolgt entweder intrauterin oder postnatal während der Stillzeit, da nahezu jede seropositive Mutter während der Laktation HCMV reaktiviert (Hamprecht and Jahn, 2007, Britt, 2007).

Prozentual deutlich seltener, aber klinisch äußerst wichtig, ist die Übertragung von HCMV im Rahmen von Transplantationen, da die Übertragung von HCMV sowohl durch die Transplantation solider Organe als auch durch Blutprodukte möglich ist und auf einen vulnerablen immunsupprimierten Patienten trifft (Gilbert and Boivin, 2005b).

## **1.7 Klinische Symptomatik**

### **1.7.1 Immunkompetente Patienten**

HCMV infiziert den Großteil aller Menschen weltweit, die Prävalenz schwankt zwischen ca. 60 % in Industriestaaten und annähernd 100 % in Entwicklungsländern (Griffiths et al., 2015). Eine HCMV-Infektion bei immunkompetenten Patienten verläuft meistens asymptomatisch oder aber zeigt eine mononukleose-ähnliche Symptomatik mit Abgeschlagenheit, Fatigue, subfebrilen Temperaturen, Muskelschmerzen und Arthralgien (Zedtwitz-Liebenstein et al., 2016). In den meisten Fällen ist eine symptomatische HCMV-Erkrankung nach der primären HCMV-Infektion auf ein geschwächtes Immunsystem zurückzuführen (Britt, 2007).

### 1.7.2 Immunsupprimierte Patienten

HCMV-Infektionen sind zum einen selbst schon kritische Erkrankungen für immunsupprimierte Patienten, zum anderen erhöhen sie aber auch das Risiko für weitere Infektionen, möglicherweise durch Störungen der Barrierefunktion oder auch durch eine Veränderung der zellulären und humoralen Abwehrfunktion (Ljungman et al., 2002). Drei große Patientengruppen sind besonders gefährdet: zum einen Frühgeborene unterhalb der 32. Schwangerschaftswoche, zum anderen Patienten, die eine Stammzelltransplantation oder eine Transplantation solider Organe erhalten haben, sowie Patienten, die an AIDS erkrankt sind. Eine HCMV-Infektion lässt sich durch das Ansteigen der Viruslast im Blut, sowie anderen Körperflüssigkeiten oder Gewebe erkennen (Ljungman et al., 2017). Das Krankheitsspektrum einer solchen HCMV-Infektion bei immunsupprimierten Patienten reicht von völlig asymptomatisch bis hin zu einer schweren HCMV-Infektion, welche verschiedene Gewebe befallen kann. Besonders häufig sind die HCMV-Pneumonie, HCMV-Hepatitis, HCMV-Retinitis, ein Befall des Gastrointestinaltraktes, Pankreatitis, Myokarditis, Enzephalitis oder eine periphere Polyneuropathie, wobei die ersten vier die wichtigste Rolle spielen (El Helou and Razonable, 2019, Steininger, 2007). Besonders bei Patienten nach solider Organtransplantation lässt sich auch häufig das sogenannte HCMV-Syndrom feststellen, welches sich mit Fieber, Abgeschlagenheit, Leukopenie, Thrombozytopenie und einer atypischen Lymphozytose äußert (Ljungman et al., 2017). Zahlreiche Studien haben weiterhin gezeigt, dass eine HCMV-Infektion für eine akute Transplantatabstoßung verantwortlich sein kann (Ljungman et al., 2002), oder Sekundärerkrankungen wie zum Beispiel ein verstärktes Auftreten einer Atherosklerose nach Herztransplantationen begünstigt (Grattan et al., 1989).

Das größte Risiko einer Manifestation haben einerseits seronegative Patienten, die ein solides Organ eines seropositiven Spenders erhalten haben, oder seropositive Patienten, die die Stammzellen eines seronegativen Spenders erhalten haben (El Helou and Razonable, 2019).

Die Behandlung von HCMV-Infektionen bei immunsupprimierten Patienten erfordert meistens den Einsatz von Virostatika und eine Veränderung der

Immunsuppression. Zum Einsatz kommen weiterhin intravenöse Immunglobuline und HCMV-spezifische Immunglobuline (Hyperimmunglobuline) oder auch der Transfer von HCMV-spezifischen T-Zellen (El Helou and Razonable, 2019).

### **1.7.3 Infektion während der Schwangerschaft**

HCMV ist die kongenitale Virusinfektion mit der höchsten Prävalenz (Kuessel et al., 2015). In Industrieländern weisen 0,4–1,2 % aller Lebendgeburten eine kongenitale HCMV-Infektion auf (Buxmann et al., 2017b). Weltweit ist die kongenitale HCMV-Infektion die führende Ursache für neurologische Schäden wie Wachstumsretardierung, Hörschäden, permanente Behinderungen und Mikrozephalie bei Kindern (Manicklal et al., 2013, Ludwig and Hengel, 2009). In Deutschland infizieren sich 0,5–4 % der Mütter das erste Mal kurz vor, oder während einer Schwangerschaft mit HCMV (Buxmann et al., 2017b). Der Hauptübertragungsweg sind hier seropositive Kleinkinder, da auch immunkompetente Kinder oft jahrelang das Virus über Speichel, Tränenflüssigkeiten und Urin ausscheiden (Staras et al., 2008, Britt, 2007). Bei 30 % der primär während der Schwangerschaft infizierten Mütter verursacht das Virus auch eine intrauterine Infektion (Hamprecht et al., 2001). Bis zu 20 % dieser kongenital infizierten Neugeborenen weisen neurologische Spätfolgen auf (Goderis et al., 2014), ca. 0,5 % versterben intrauterin oder postpartal (Dollard et al., 2007). Die klassische Trias kongenital infizierter Feten besteht aus Ikterus, Petechien und Hepatosplenomegalie (Buonsenso et al., 2012). Die klinische Symptomatik ist allerdings sehr variabel, insgesamt nimmt aber der Schweregrad mit dem Gestationsalter ab (Enders et al., 2011).

Eine lange Zeit wurde angenommen, dass der Großteil der vertikal übertragenen Infektionen in der Schwangerschaft durch Primärinfektionen erfolgte. Epidemiologische Studien der letzten Jahre zeigten jedoch eine hohe Anzahl von HCMV-Infektionen bei Kindern von immunkompetenten Müttern, sodass die Möglichkeit in Betracht gezogen werden muss, dass auch Reinfektionen mit einem anderen HCMV-Stamm und seltener auch HCMV-Reaktivierungen einen Risikofaktor darstellen könnten (Gerna and Lilleri, 2019).

Der effektivste Weg, eine kongenitale HCMV-Infektion zu vermeiden, sind hygienische Maßnahmen (Buxmann et al., 2017a). Tritt eine primäre HCMV-Infektion im ersten Trimester einer Schwangerschaft auf, können Hyperimmunoglobulingaben in zweiwöchentlichem Abstand die maternal-fetale Transmission bis zur 20. Schwangerschaftswoche verhindern (Kagan et al., 2019, Hamprecht and Jahn, 2007). Die Hyperimmunoglobuline enthalten neutralisierende Antikörper, die sowohl den viralen Eintritt in die Wirtszellen verhindern, als auch die Phagozytose infizierter Zellen steigern (Cui et al., 2013). Eine andere Behandlungsmöglichkeit ist der off-label Einsatz von Valaciclovir (Leruez-Ville et al., 2016). Postpartal kann Ganciclovir, beziehungsweise Valganciclovir eingesetzt werden und so besonders Hörschäden verhindern oder wenigstens verbessern (Kimberlin et al., 2015).

#### **1.7.4 Latenz**

Latenz bedeutet das Verbleiben des viralen Genoms in der Abwesenheit der Produktion von infektiösen Virionen, aber mit der Fähigkeit unter gewissen Umständen zu reaktivieren (Sinclair, 2008). Wichtigster Ort der Latenz sind CD<sub>34+</sub>-Zellen der myeloiden Linie (Sissons and Wills, 2015). Diskutiert werden aber auch andere Zellen, wie neuronale Vorläuferzellen, die möglicherweise latent infiziert werden können (Dupont and Reeves, 2016). Während der latenten Phase werden virale Proteine nur auf einem Minimum exprimiert und keine neuen infektiöse Virionen produziert (Kalejta, 2008a). Dies bedeutet allerdings nicht, dass eine latent infizierte Zelle unbeeinflusst von HCMV bleibt. Im Gegenteil, verändert HCMV die zelluläre Genexpression so, dass das Immunsystem des Wirtes möglichst gut umgangen werden kann und eine Reaktivierung erleichtert wird (Sissons and Wills, 2015). So wurde zum Beispiel gezeigt, dass in latent infizierten Zellen der Multi-Drug Transporter MRP1 herunterreguliert wird. Dies könnte für Behandlungsansätze in der Zukunft eine wichtige Rolle spielen, da Medikamente wie zum Beispiel Vincristin in Zellen ohne MRP1 akkumulieren und so die Zellen zerstören können (Sissons and Wills, 2015).

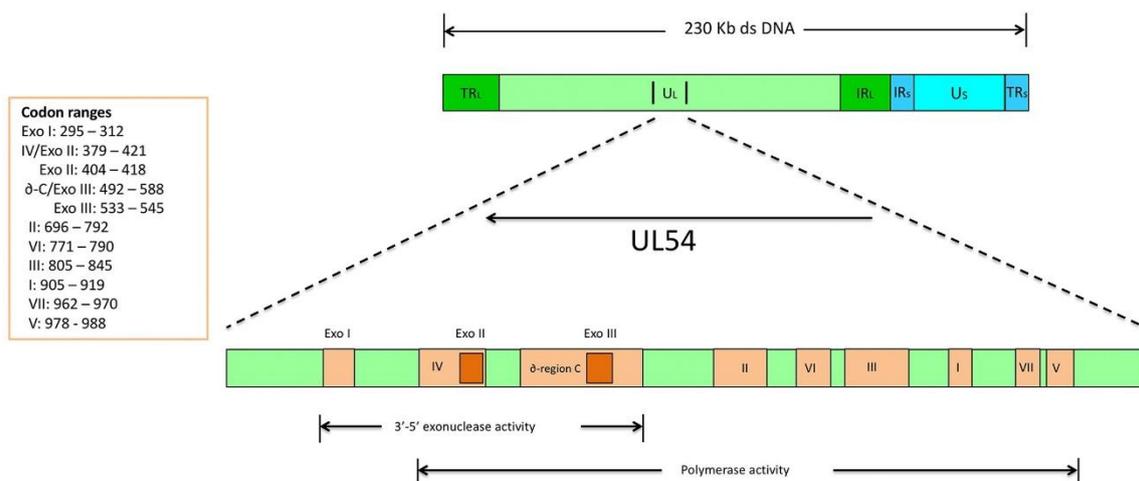
Vor allem die Differenzierung der myeloiden Vorläuferzellen zu dendritischen Zellen oder Makrophagen führt zu einer Reaktivierung von HCMV (Reeves and Sinclair, 2013). Eine Reaktivierung erfolgt wahrscheinlich regelmäßig in gesunden Individuen, wird aber durch deren Immunsystem erfolgreich kontrolliert und bleibt meistens unbemerkt. Besonders die T-Zellen und die NK-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Kontrolle von HCMV-Infektionen (Sissons and Wills, 2015). In immunsupprimierten Patienten, bei denen die T-Zell-Antwort und die NK-Zellen beeinflusst sind, ist die Reaktivierung deswegen ein Grund für erhöhte Morbidität und Mortalität (Rubin, 1990).

## 1.8 Zielstrukturen antiviraler Substanzen

### 1.8.1 UL54

Bei dem Proteinprodukt von UL54 handelt es sich um die virale DNA-Polymerase von HCMV. Da diese für die Replikation der viralen DNA verantwortlich ist, spielt sie eine Schlüsselrolle in der lytischen Phase der Infektion. (Zarrouk et al., 2017). Neben der Polymerasefunktion hat pUL54 auch eine Exonukleasefunktion (Gilbert and Boivin, 2005b). Der Polymeraseanteil besteht aus acht konservierten Regionen, der Exonukleaseanteil aus drei konservierten Regionen (Gilbert and Boivin, 2005b). Durch die Schlüsselposition in der viralen Replikation eignet sich pUL54 auch besonders gut als Ziel von Virostatika (Andrei et al., 2009).

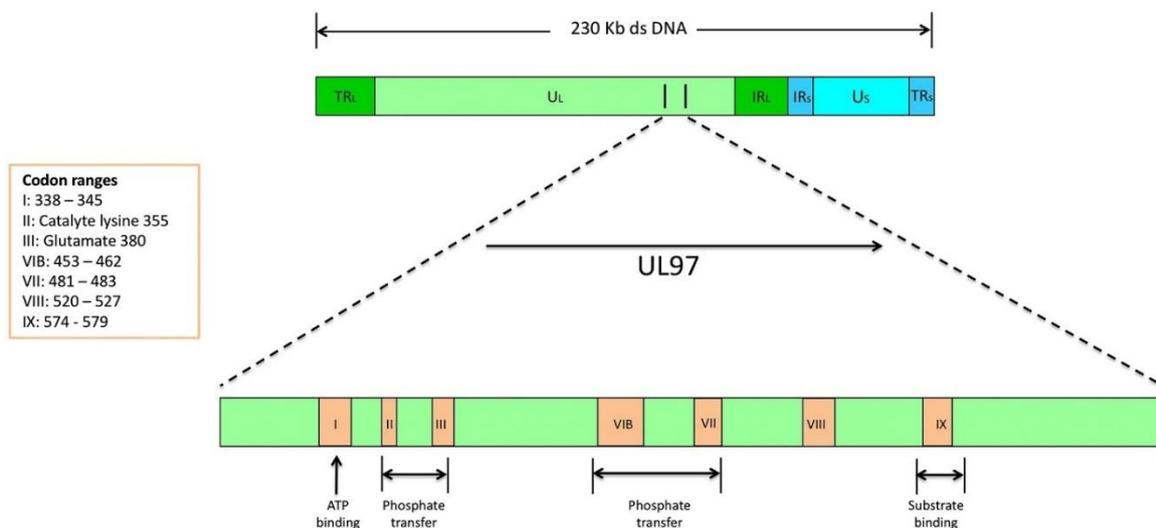
Die UL54-DNA-Polymerase wird mit früher Kinetik exprimiert und formt mit einigen anderen viralen Proteinen, wie zum Beispiel pUL44, den viralen Replikationskomplex (Lurain and Chou, 2010).



**Abbildung 4:** Position von UL54 in dem HCMV-Genom und funktionelle Domänen. Abbildung mit freundlicher Genehmigung aus Campos et al. (Campos et al., 2016).

### 1.8.2 UL97

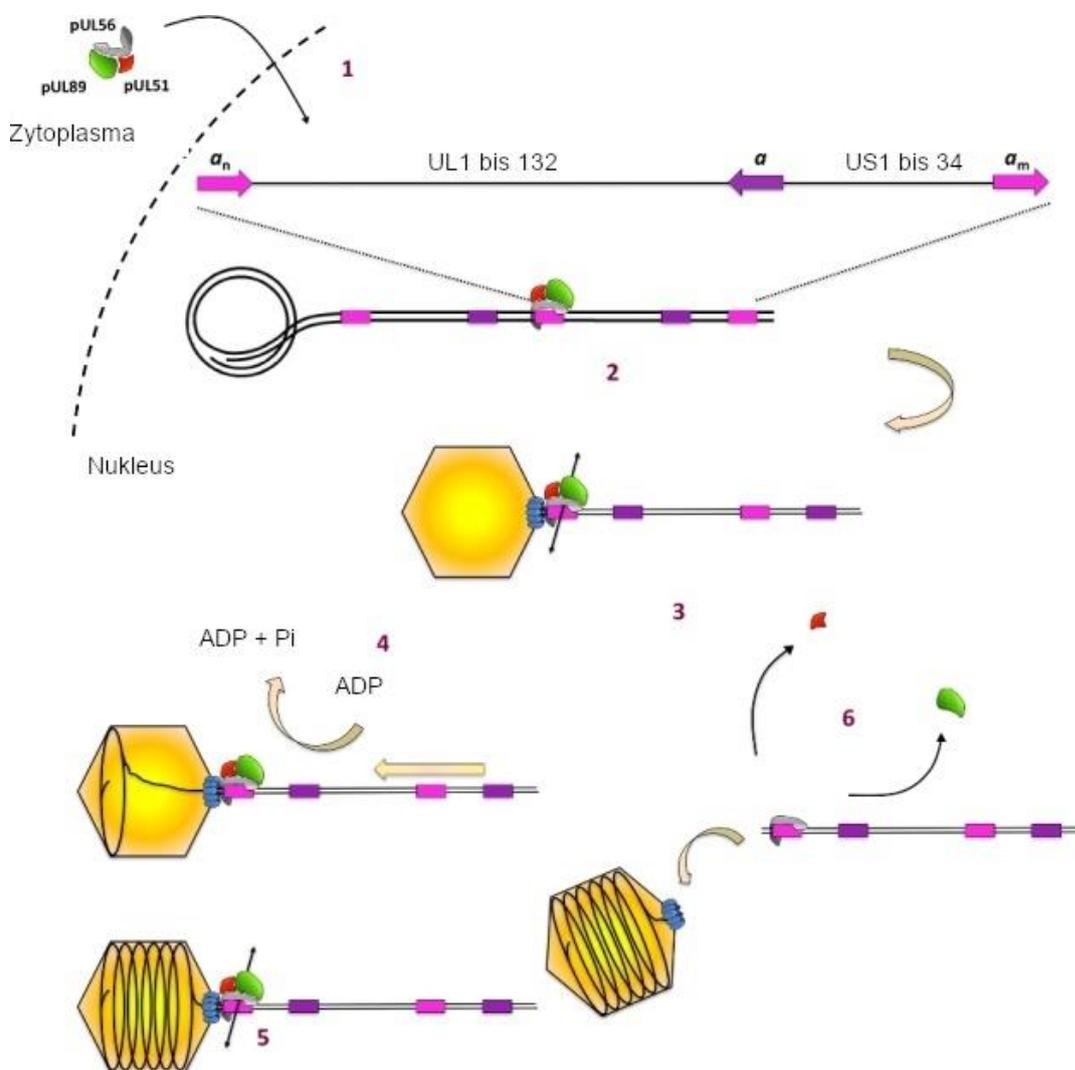
Der Open Reading Frame von UL97 kodiert für eine Serin-Threonin-Phosphotransferase und ist Teil der Tegumentproteine, wird aber auch schon früh in der Infektionsphase exprimiert (Littler et al., 1992b, Varnum et al., 2004). pUL97 spielt eine essenzielle Rolle in der Virusreplikation, indem es zahlreiche zelluläre und virale Proteinsubstrate phosphoryliert (Prichard, 2009, Prichard et al., 1999). Zum Beispiel stimuliert die UL97-Serin-Threonin-Phosphotransferase den Wirtszellzyklus, indem sie das Retinoblastom-Protein phosphoryliert und schafft so optimale Bedingungen für die virale DNA-Replikation. Außerdem fördert pUL97 die Expression viraler Proteine, unterstützt die Bildung von Virionen und ist maßgeblich für die Auswanderung der reifen Kapside aus dem Nukleolus (Prichard, 2009). Von klinischem Interesse ist pUL97, da es das Virostatikum Ganciclovir zu Ganciclovir-Monophosphat phosphoryliert und so für die Bildung der aktiven Form maßgeblich ist (Littler et al., 1992a).



**Abbildung 5:** Position von UL97 in dem HCMV-Genom und funktionelle Domänen. Abbildung mit freundlicher Genehmigung aus: Campos et al. (Campos et al., 2016).

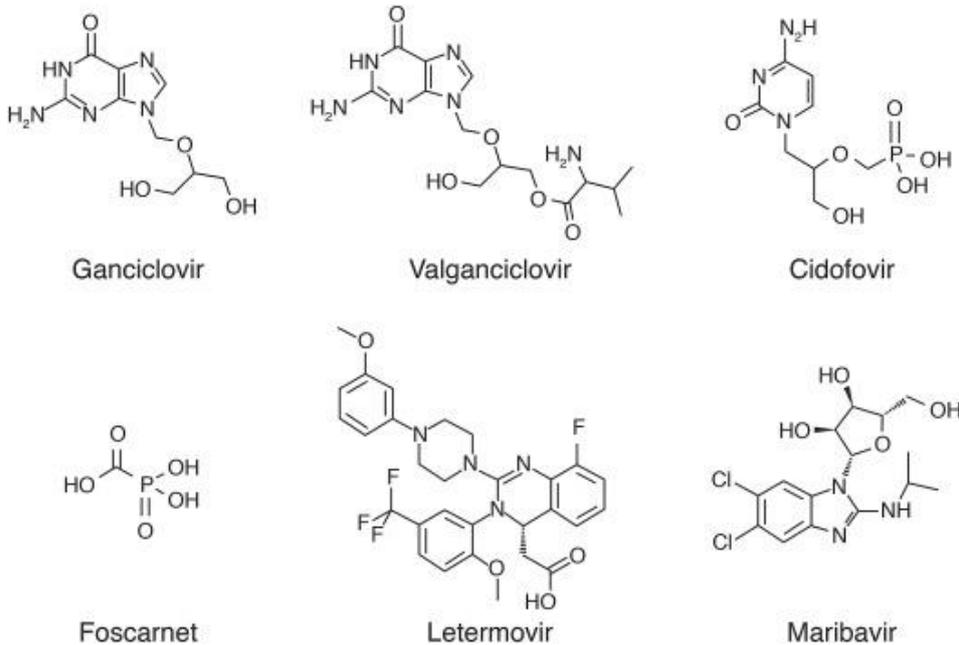
### 1.8.3 Terminasekomplex

Terminasen sind für die Verpackung des viralen Genoms in Kapside zuständig (Gentry et al., 2019). Die HCMV Terminase besteht aus zwei Untereinheiten, die ATPase pUL56, die Nuklease pUL89 und eine potentielle dritte Untereinheit pUL51 (Borst et al., 2013). Diese Strukturen eignen sich besonders gut als medikamentöse Angriffsstrukturen, da es keine korrespondierenden Strukturen in humanen Zellen gibt (Gentry et al., 2019).



**Abbildung 6:** Verpackung des viralen Genoms in Kapside. 1: Terminasekomplex transloziert in den Nucleus. 2: Der Terminasekomplex bindet an der packaging Erkennungssequenz der viralen DNA. 3: Der DNA-Doppelstrang wird gespalten. 4: Durch die ATPase-Aktivität des Terminasekomplexes wird die Translokation der viralen DNA in das Kapsid ermöglicht. 5: Überschüssige DNA wird abgeschnitten. 6: Der Terminasekomplex dissoziiert von dem befüllten Kapsid (Abbildung modifiziert nach Ligat et al. (Ligat et al., 2018)).

## 1.9 Antivirale Substanzen



**Abbildung 7:** Chemische Strukturen der aktuell wichtigsten antiviralen Substanzen, die gegen HCMV eingesetzt werden können. Abbildung mit freundlicher Genehmigung aus Piret und Boivin (Piret and Boivin, 2019).

### 1.9.1 Ganciclovir / Valganciclovir

Bei Ganciclovir handelt es sich um ein Desoxyguanosinanalogen (Martin et al., 1983). Ganciclovir zeigt gegen die sämtliche Gruppe der Herpesviren eine potente antivirale Aktivität (Field et al., 1983, Cheng et al., 1983). 1988 wurde es als erstes Medikament für die Behandlung von HCMV von der FDA zugelassen (Gilbert and Boivin, 2005a). Es ist nach wie vor das Mittel erster Wahl in der HCMV Behandlung und Prophylaxe (El Helou and Razonable, 2019).

In vivo wird Ganciclovir durch das Genprodukt von UL97, die HCMV Serin-Threonin-Phosphotransferase, zu Ganciclovir-Monophosphat phosphoryliert und dann durch zelluläre Kinasen zu der aktiven Form Ganciclovir-Triphosphat. Dieses fungiert als ein Nukleosidanalogen, welches an der Pyrophosphatbindungsstelle der viralen DNA-Polymerase, dem Genprodukt von UL54, mit Guanodin um den Einbau in die HCMV-DNA konkurriert. Wenn Ganciclovir-Monophosphat in die virale DNA eingebaut wird, wird die Replikation

stark verlangsamt, oder sogar die Kettenelongation gestoppt (Biron et al., 1985). Der Einbau von Ganciclovir-Triphosphat erfolgt in geringeren Maßen allerdings auch durch zelluläre Polymerasen und führt so zu zahlreichen Nebenwirkungen (Schreiber et al., 2009). Die wichtigste Nebenwirkung von Ganciclovir ist seine myelosuppressive Wirkung. Dies kann besonders bei Patienten nach Stammzelltransplantation und bei Frühgeborenen zu Problemen führen (Piret and Boivin, 2019, Meyer-Wittkopf et al., 2009). Weitere unerwünschte Nebenwirkungen sind unter anderem eine Nephrotoxizität, Azoospermie, Fieber, Asthenie, Diarrhoe, Stomatitis, Pankreatitis, eine Beeinträchtigung der Leberfunktion, Kopfschmerzen und möglicherweise ist es außerdem teratogen (El Helou and Razonable, 2019).

Aufgrund der geringen Bioverfügbarkeit von oralem Ganciclovir (~ 6 %) wurde die veresterte Form Valganciclovir entwickelt, welche oral gegeben werden kann (Pescovitz et al., 2000). Valganciclovir wird im Darm von PEPT1 erkannt, während Ganciclovir nicht erkannt wird (Sugawara et al., 2000). Nach Hydrolysierung durch die Valaciclovirase gelangt es als Ganciclovir in die Blutbahn (Lai et al., 2008).

### **1.9.2 Cidofovir**

Bei Cidofovir handelt es sich um ein Cytidin-Nukleotidanalogen, welches gegen eine große Anzahl von DNA-Viren wirksam ist. Durch Phosphorylierung durch eine zelluläre Kinase wird es zu seiner aktiven Form umgewandelt, von pUL54 in die virale DNA eingebaut und führt so zum Kettenabbruch (Cihlar and Chen, 1996). Cidofovir wird als Zweitlinientherapie bei HCMV-Infektionen, welche resistent oder refraktär gegenüber Ganciclovir sind, oder bei Unverträglichkeiten gegen Ganciclovir verwendet (Razonable and Humar, 2019). Cidofovir ist stark nephrotoxisch, vor allem durch seine apoptotische Wirkung an den Tubuluszellen. Dadurch kann es zu renaler tubulärer Azidose, Salzverlust oder einem Fanconi-Syndrom kommen (Kazory et al., 2007). Weiterhin wurden unerwünschte Nebenwirkungen wie Anämien oder Neutropenien beobachtet (Jacobson et al., 1999).

### 1.9.3 Foscarnet

Foscarnet ist ein Analogon des Pyrophosphats und war 1991 das zweite Medikament, welches für die Behandlung der HCMV Retinitis bei HIV Patienten zugelassen wurde (Biron, 2006). Foscarnet hemmt reversibel die virale DNA-Polymerase pUL54, indem es direkt an der Pyrophosphatbindungsstelle bindet und so verhindert, dass pUL54 durch Spaltung von Pyrophosphat Phosphatbindungen zwischen den Nukleotiden ausbilden kann. Foscarnet bedarf keiner vorherigen Aktivierung (Chrisp and Clissold, 1991). Foscarnet ist nephrotoxisch, meistens in Form einer akuten Tubulusnekrose. Dadurch kann es auch zu Elektrolytstörungen kommen, meistens Hypocalciämie, Hypokaliämie und Hypomagnesiämie (El Helou and Razonable, 2019) (Campos et al., 2016). Weiterhin kann Foscarnet Anämien oder lokale Irritationen verursachen (El Helou and Razonable, 2019). Aufgrund dieser starken Nebenwirkungen wird Foscarnet nur als Zweitlinientherapie genutzt, eignet sich aber besonders für Patienten mit einer Myelosuppression nach einer Stammzelltransplantation oder für Patienten, bei denen es nach Ganciclovirgabe zu einer Neutropenie oder Leukopenie kam (Ariza-Heredia et al., 2014).

### 1.9.4 Maribavir

Maribavir ist ein direkter Inhibitor der viralen UL97 Serin-Threonin-Phosphotransferase (Williams et al., 2003). Maribavir hat zu dem jetzigen Zeitpunkt noch keine klinische Zulassung, klinische Studien haben aber eine gute Verträglichkeit gezeigt und es laufen Phase III Studien zur präemptiven Behandlung asymptomatischer HCMV-Infektionen bei stammzelltransplantierten Patienten und für die Behandlung resistenter und refraktärer HCMV Stämme (El Helou and Razonable, 2019). Als unerwünschte Nebenwirkungen wurden Geschmacksstörungen, Übelkeit, Diarrhoen, Transaminasenerhöhungen, Tremor, periphere Ödeme und Kopfschmerzen beobachtet (El Helou and Razonable, 2019). Mutationen in pUL97 können Resistenzen gegen Maribavir verursachen (Chou, 2015a).

### **1.9.5 Letermovir (AIC246)**

Während alle anderen bis jetzt gegen HCMV zugelassenen antiviralen Substanzen die virale Polymerase beeinflussen, inhibiert Letermovir den viralen Terminasekomplex. Durch diesen neuen Behandlungsansatz ist Letermovir auch wirksam, wenn Resistenzen gegen Ganciclovir, Foscarnet oder Cidofovir vorliegen (Melendez and Razonable, 2015). Mutationen in UL51, UL56 und UL89 können allerdings Resistenzen gegen Letermovir bewirken, vermutlich mit nur einem geringen Einfluss auf die virale Fitness (Chou, 2015b, Chou et al., 2018). Letermovir wirkt hochspezifisch gegen HCMV, nicht aber gegen andere Herpesviren oder nichthumane Cytomegalieviren (Ligat et al., 2018). Sowohl die orale als auch die intravenöse Applikation ist möglich (Erb-Zohar et al., 2017, Chemaly et al., 2014). Marty et al. beschrieben, dass die Letermovirprophylaxe nach einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation mit einem niedrigeren Risiko für eine klinisch relevante HCMV-Infektion als bei einer placebobehandelten Patientengruppe resultierte (Marty et al., 2017b). Letermovir wird grundsätzlich gut vertragen, die häufigsten unerwünschten Nebenwirkungen sind Übelkeit und Diarrhoe (Marty et al., 2017a). Ende 2017 wurde Letermovir unter dem Markennamen Prevymis zur HCMV-Prophylaxe bei stammzelltransplantierten Patienten zugelassen (Gentry et al., 2019). Off-label wird es aber auch in der Behandlung multiresistenter HCMV-Infektionen oder in der Sekundärprophylaxe nach Transplantation solider Organe genutzt (El Helou and Razonable, 2019).

## **1.10 Antivirale Resistenzen**

Bekannte resistenzauslösende Mutationen gegen die am häufigsten gegen HCMV eingesetzten Virostatika finden sich in der UL97-Kinase (GCV) und der UL54-Polymerase (GCV, CDV, FOS) (Lurain and Chou, 2010). Welche Mutationen resistenzauslösend sind, kann nur durch phänotypische Assays bestätigt werden. Diese sind allerdings sehr zeitaufwändig. Im klinischen Alltag wird daher vor allem auf genotypische Assays zurückgegriffen. Diese können allerdings nur schon bekannte Mutationen nachweisen, da sie nicht zwischen

einem Polymorphismus und einer resistenzauslösenden Mutation unterscheiden können.

Risikofaktoren für eine Resistenzbildung sind eine hohe Viruslast, eine lange Nutzung von anti-HCMV Medikamenten, eine schwere T-Zell-Depletion, rekurrente HCMV-Infektionen oder eine verminderte Wirksamkeit der Virostatika, wenn zum Beispiel die Dosis auf Grund von unerwünschten Nebenwirkungen verringert werden muss (El Chaer et al., 2016, Lurain and Chou, 2010, Gilbert and Boivin, 2005b). Eine Infektion mit einem resistenten HCMV Stamm kommt bei 5-14 % aller Patienten nach einer Transplantation vor (Maertens et al., 2019). Hinweise für eine Resistenz sind eine erneute Verschlechterung der Symptome oder ein Ansteigen der Viruslast trotz adäquater Dosierung des Virostatikums (Gilbert and Boivin, 2005b). Vor allem unter dem Selektionsdruck einer langen antiviralen Behandlung können auch mehrere Mutationen akkumulieren und zu einer verstärkten Resistenz gegen ein Virostatikum oder auch zu Resistenzen gegen mehrere Virostatika führen (Lurain and Chou, 2010).

Mutationen in UL97 führen zu Resistenzen gegen Ganciclovir, nicht aber gegen Cidofovir und Foscarnet, da nur Ganciclovir von pUL97 aktiviert werden muss (Lurain and Chou, 2010). Resistenzauslösende Mutationen fanden sich vor allem in den Codons 460, 520 und vor allem auch zwischen 591-607. Der Bereich von 591-607 ist für die Bindung von Ganciclovir wichtig, Mutationen in diesem Bereich scheinen aber nicht kritisch für die biologische Funktion von pUL97 zu sein (Chou et al., 2002, Prichard et al., 1999, Lurain and Chou, 2010). In über 80 % können die Mutationen M460V/I, H520Q, C592G, A594V, L595S und C603W bei Patienten, die Ganciclovir als initiale Therapie erhalten haben, als resistenzauslösende Mutationen gefunden werden (Lurain and Chou, 2010).

Mutationen in UL54 können entweder die Bindung von Virostatika an die Polymerase behindern oder aber durch eine Verbesserung der Exonukleasefunktion zu einer verstärkten Entfernung der schon in die DNA eingefügten Virostatika führen (Lurain and Chou, 2010). Zahlreiche Beobachtungen zeigen, dass auch eine lange Ganciclovirbehandlung zu mehr

UL54 Mutationen führt und dass Resistenzen vor allem bei gleichzeitig auftretenden UL97 Mutationen vorkommen (Smith et al., 1997). Abhängig von der Region, in der die Mutationen auftreten, kann es zu Resistenzen gegen Ganciclovir, Cidofovir, Foscarnet oder auch gegen alle drei Virostatika gleichzeitig kommen. So scheinen Resistenzen gegen Ganciclovir/Cidofovir vor allem durch Mutationen in der Exonukleasedomäne und Region V verursacht zu werden, Foscarnetresistenzen vor allem in Region II und III und Resistenzen gegen Foscarnet und gleichzeitig in geringerem Level Ganciclovir in der Region III (Lurain and Chou, 2010). Anders als bei UL97-Mutationen, machen bei UL54-Mutationen nicht wenige Mutationen den Großteil der resistenzverursachenden Mutationen aus. Dies und die Tatsache, dass es zwischen den Stämmen zahlreiche Sequenzpolymorphismen gibt, bedingt, dass es bei UL54 deutlich aufwändiger ist, eine resistenzauslösende Mutation zu identifizieren (Lurain and Chou, 2010, Chou et al., 1999). Allerdings scheinen UL54 Mutationen das Wachstum von HCMV deutlich häufiger zu behindern, sodass UL97 Mutationen insgesamt häufiger sind (Chou et al., 2007).

## 1.11 Impfung

Eine Impfung gegen HCMV könnte pro Jahr tausende Leben retten, es gibt allerdings zahlreiche Schwierigkeiten, die die Entwicklung eines geeigneten Impfstoffs behindern. So bedingt vor allem der große genetische Polymorphismus der HCMV-Stränge, dass bis jetzt getestete Impfungen nur einen sehr begrenzten Schutz erbrachten (Fu et al., 2014). Außerdem ist HCMV in der Lage, die Präsentation viraler Antigene über MHC I herunterzuregulieren (Reddehase, 2002). Das Ziel einer Impfung wäre, sowohl eine Primärinfektion zu verhindern, als auch die Reinfektion mit einem anderen Stamm beziehungsweise die Reaktivierung einer latenten Infektion zu verhindern (Gerna and Lilleri, 2019). Die Forschungsergebnisse zum jetzigen Zeitpunkt deuten darauf hin, dass der ideale Impfstoff zum einen gB enthalten sollte, welches sowohl die humorale, als auch die T-Zell-Antwort stimulieren kann; zum anderen den pentameren Komplex, da dieser die Bildung neutralisierender Antikörper am stärksten zu

induzieren scheint, und möglicherweise drittens pp65, welches die stärkste HCMV-spezifische T-Zell-Antwort hervorruft (Gerna and Lilleri, 2019). Diesen Ansatz verfolgt auch ein mRNA-Impfstoff von Moderna, der aus einer mRNA-Mischung aus fünf mRNAs, die für den pentameren Komplex kodieren und einer mRNA, die für gB kodiert, besteht. Diese wird aktuell in einer Phase-II-Studie getestet (Nelson et al., 2020).

## 1.12 Zielsetzung der Arbeit

Das humane Cytomegalovirus (HCMV) kann bei Patienten nach Organ- und Stammzelltransplantation zu lebensbedrohlichen Organmanifestationen führen und ist weltweit die wichtigste kongenitale Virusinfektion. Durch eine antivirale Therapie mit Ganciclovir, Cidofovir oder Foscarnet kann eine frühe klinisch manifeste Erkrankung reduziert werden. Die Wahrscheinlichkeit einer Virostatikaresistenzentwicklung steigt jedoch mit vermehrter und länger anhaltender Therapiedauer an. Die molekulare Ursache der Resistenzen gegen Ganciclovir, Cidofovir oder Foscarnet sind Mutationen in der UL97-Serin-Threonin-Phosphotransferase und im viralen Polymerasegen UL54. Im klinischen Alltag ist eine schnelle Zuordnung der Mutationen wichtig. Um eine Unterscheidung zwischen Polymorphismen und resistenzauslösenden Mutationen treffen zu können, müssen in genotypischen Assays neu aufgetretene Mutationen phänotypisch charakterisiert werden. Hierfür sollen mittels einer Marker-Transfer-Analyse mehrere neu entdeckte Mutationen in einen gegenüber den Virostatika sensitiven Laborstamm eingefügt und dann mittels Plaque-Reduktions-Assays funktionell charakterisiert werden. Da das Wachstumsverhalten von HCMV-Stämmen zudem einen großen Einfluss auf die antivirale Behandlung haben kann, soll in dieser Arbeit das Wachstumsverhalten der einzelnen Mutationen über die Analyse eines Ein-Schritt-Wachstumszyklus beobachtet und mit dem Referenzstamm HCMV-TB40-BACKL7-UL32EGFP verglichen werden.

Für die Mutagenese von DNA-Viren eignet sich besonders gut das bakterielle artifizielle Chromosom (BAC), ein von *E. coli* abgeleiteter Vektor, welches DNA-

Sequenzen von bis zu 300 kbp beinhalten kann. Der Vorteil von BACs ist, dass sie in Bakterien stabil bleiben. Außerdem kann der Erfolg der Mutagenese durch positive Selektionsmarker wie Antibiotikaresistenzgene noch vor Transfektion auf Zellkulturen überprüft werden, sodass sichergegangen werden kann, dass die Zellkultur nur mit einem Virus mit der gewünschten Mutation infiziert wird (Borst et al., 1999). Mit der 2006 eingeführten en-passant-Mutagenese von Tischer et al. ist es außerdem möglich, Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen in das virale Genom einzufügen, ohne dass Fremdsequenzen zurückbleiben (Tischer et al., 2006).

In dieser Arbeit sollen deswegen mittels „en-passant“ BAC-Technologie die von Houldcroft et al. neu detektierten Mutationen UL97 S512Stop, UL97 C480F, UL97 I429F, UL54 P522Q und die Doppelmutation UL54 P522Q / UL97 C480F, sowie die von Sedlak et al. gefundene Doppelmutation UL54 V715M / UL97 L595S generiert und anschließend funktionell charakterisiert werden (Houldcroft et al., 2016, Hall Sedlak et al., 2013).

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 HCMV-Mutationen

Die UL54 HCMV-Mutation P522Q und die UL97-Mutationen C480F, S512Stop und I429F wurden in der Publikation: "Detection of Low Frequency Multi-Drug Resistance and Novel Putative Maribavir Resistance in Immunocompromised Pediatric Patients with Cytomegalovirus" von Houldcroft et al. beschrieben, aber noch nicht genauer charakterisiert (Houldcroft et al., 2016). In diese Studie wurden elf Patienten aus dem Great Ormond Street Hospital for Children eingeschlossen, bei denen hohe HCMV Viruslasten über zwei oder mehr Wochen auftraten und der klinische Verdacht auf eine Virostatikaresistenz bestand. UL54 P522Q und UL97 C480F wurden bei Patientin B, einem zweijährigen Mädchen mit Dyskeratosis congenita gefunden, welches im Verlauf verstarb. UL97 S512Stop trat bei Patient G, einem neunjährigen Jungen mit Kostmann Syndrom 63 Tage nach Stammzelltransplantation auf, konnte aber in folgenden Proben nicht mehr nachgewiesen werden. UL97 I429F wurde bei Patient K, einem zwölf Jahre alten Jungen nach Herztransplantation, detektiert. UL54 V715M ist eine der häufigsten UL54 Mutation und verursacht eine Resistenz gegen Foscarnet (Cihlar et al., 1998, Gilbert and Boivin, 2005b). UL97 L595S wurde von Wolf et al (Wolf et al., 1995) beschrieben und zählt zu den häufigsten UL97 Mutationen, die eine Resistenz gegen Ganciclovir auslösen können (Gilbert and Boivin, 2005b). In Kombination wurden die Mutationen von Sedlak et al. bei einem 66 jährigen Patienten (Patient 14) nach bilateraler Lungentransplantation gefunden, hierbei verschwand UL97 L595S nach Umstellung von Ganciclovir auf Foscarnet wieder, während UL54 V715M persistierte (Hall Sedlak et al., 2013).

**Tabelle 2:** Übersicht über die Patienten, bei denen die in dieser Arbeit untersuchten Mutationen gefunden wurden. Patienten aus Houldcroft et al. (Patient B, G, K), sowie Sedlak et al. (Patient 14) (Houldcroft et al., 2016, Hall Sedlak et al., 2013). Fett gedruckt sind die in dieser Arbeit charakterisierten Mutationen.

	<b>Patient B</b>	<b>Patient G</b>	<b>Patient K</b>	<b>Patient 14</b>
<b>Alter</b>	2J.	9J.	12J.	66J.
<b>Geschlecht</b>	w	m	m	m
<b>UL54-Mutationen</b>	<b>P522Q</b> ; D301N; D588N; V715M; P383S; C592S; R593S; T700P	C211F; E235K; E944D; S897L; D898N	keine	<b>V715M</b>
<b>UL97-Mutationen</b>	<b>C480F</b> ; T409M; M460I; C592G; C607Y	<b>S512Stop</b>	<b>I429F</b>	<b>L595S</b>
<b>Grunderkrankung</b>	Dyskeratosis congenita	Kostmann-Syndrom	Herztransplantation	Bilaterale Lungentransplantation
<b>Höchste Viruslast (Genkopien / ml WB)</b>	65.611.500	330.209	393.192	Ca. 794.328
<b>Virämiedauer (Tage &gt; 104 gc / ml)</b>	200	38	12	Ca. 300
<b>Eingesetzte antivirale Therapie</b>	FOS, GCV, CDV, MBV, LEF, ART, CMV-IVIG	FOS, GCV, CDV, ACV	GCV, V-GCV	GCV, V-GCV, FOS, ACV
<b>Outcome</b>	CMV-Kolitis, CMV-Pneumonitis, Tod	Stammzelltransplantation	Andauernde virostatistische Therapie	Andauernde virostatistische Therapie

### 2.1.2 Zellen

Für die durchgeführten Versuche wurden humane Vorhautfibroblasten (HFF) (ATCC® SCRC1041™) genutzt. Es wurden Zellen zwischen Passage 7 und 30 verwendet.

Humane retinale Pigmentepithelzellen (ARPE-19) (ATCC® CRL-2302™) (etabliert 1986 von Amy Aotaki-Keen, (Dunn et al., 1996)) wurden ebenfalls von ATCC bezogen und zwischen Passage 15 und 30 genutzt.

### 2.1.3 Bakterien

*E. coli* GS1783 wurde freundlicherweise von Gregory Smith (Northwestern University, Chicago) zur Verfügung gestellt. In diesen Stamm wurde ein defekter  $\lambda$ -Prophage in das Genom integriert. Dieser Prophage kodiert für die Gene Red $\alpha$ , Red $\beta$  und Red $\gamma$ . Die Expression dieser Gene ist durch einen temperatursensitiven Promoter reguliert. Zudem wurde das Gen für die Endonuklease I-SceI in das Genom von GS1783 eingefügt. Dieses Gen, ursprünglich aus *Saccharomyces cerevisiae* isoliert, wird durch einen Arabinose-induzierten Promoter reguliert (Tischer et al., 2010).

### 2.1.4 BACs

Das Bacterial Artificial Chromosome (BAC) *TB40-BACKL7-UL32EGFP*, eingefügt in *E. coli* GS1783, wurde freundlicherweise von Christian Sinzger (Universitätsklinikum Ulm) zur Verfügung gestellt.

TB40-BACKL7-UL32EGFP enthält das Genom des endotheliotropen HCMV Laborstrangs TB40/E. TB40/E repliziert mit gleicher Effizienz sowohl in Epithel- und Endothelzellen als auch in Fibroblasten und ist deswegen für die Co-Kultur, welche für die phänotypische Charakterisierung der Mutationen angewandt wurde, geeignet (Sinzger et al., 2008). Der BAC Vektor wurde in die Region zwischen US2 und US6 integriert und ersetzte diese. In vivo ist diese Region mitverantwortlich für die MHC-I und MHC-II-Degradation, hat aber keinen Einfluss auf die Replikation in der Zellkultur oder die Wirkung der einzelnen Virostatika (Frascaroli et al., 2018, Sinzger et al., 2008). Zusätzlich zu dem gewöhnlichen mini-F-Gen kodiert der BAC-Vektor für ein Chloramphenicolresistenzgen. Dieses erlaubt die Selektion BAC-enthaltener *E. coli*. Außerdem enthält das BAC ein EGFP-Gen, welches an den Open

Reading Frame von UL32 fusioniert ist. Expression des Kapsid-assoziierten Tegmentum Proteins UL32 resultiert in der Synthese des grün fluoreszierenden Fusionproteins UL32EGFP (Sampaio et al., 2005). UL32 wird mit später Kinetik exprimiert. Eine Virusinfektion kann dann mit einem Fluoreszenzmikroskop erkannt werden.

### 2.1.5 Medien für die Zellkultur

- Eagle Minimum Essential Medium (MEM) (Gibco)
- Penicillin / Streptomycin (Gibco)
- Fetales Kälberserum (FCS) (Gibco)  
*Hitzeinaktiviert: 1h; 56 °C*
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco)
  - + 5 % FCS
  - + 1 % Penicillin/Streptomycin
- Phosphatgepufferte Saline (DPBS) (Dulbecco)
- TrypLE Express 1x (Gibco)
- Serum-free Type Cell Freezing Medium (Bambanker)
- MBS Medium: MEM
  - +6 % Lösung 3 des Stratagene Mammalian Transfection Kits (Stratagene)
- Glycerol Schock Lösung:
  - 20 % Glycerol (Applichem)
  - 50 % 2x Hepes (Genaxxon)
  - 30 % Ampuwa (Roth)  
*steril filtriert*
- 2x Hepes
  - 50 mM Hepes
  - 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
  - 280 mM NaCl  
*pH 7,13*
- Trypanblau (Gibco)

### 2.1.6 Virostatika

- Ganciclovir (Stammlösung 196 mM) (Roche)
- Cidofovir (Stammlösung 270 mM) (Gilead Sciences)
- Foscarnet (Stammlösung 80 mM) (Astra Zeneca)

### 2.1.7 Medien für die Bakterienkultur

- LB- Medium (Luria / Miller) (Roth)
- LB-Agar (Luria / Miller) (Roth)
- Antibiotika:
  - Kanamycin (Q-Bio Gene)  
*Stammlösung 50 mg / ml; eingesetzt 1:1000*
  - Chloramphenicol (Q-Bio Gene)  
*Stammlösung 10 mg / ml; eingesetzt 1:400*
- Glycerolstock:
  - 700 µl Übernachtskultur
  - 300 µl 50 % Glycerollösung, *sterilfiltriert*
- SOC Medium (Biolabs)

### 2.1.8 Reagenzien für die PCR

- Wasser, steril und filtriert (Roth)
- Pwo Master (Roche)
- 10x PCR-Puffer (Roche)
  - Tris HCl, pH 8,3
  - 500 mM KCl
- Primer (Biomers.net)
- Taq DNA-Polymerase (Roche)
- MgCl<sub>2</sub>-Lösung 25 mM (Roche)

- Plasmid pEPKan-S ist ein Geschenk von Klaus Osterrieder

### 2.1.9 Primer für die Mutagenese-PCR und Sequenzierungsprimer

Das Nukleotid, welches die Aminosäuresäuresubstitution induziert, ist jeweils großgeschrieben, unterstrichen und fett unterlegt.

**Tabelle 3:** Verwendete Primer für die UL54-Region

	<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz 5' → 3'</b>
En-passant Mutagenese	P522Q forward long	cctgCGGcaacgcaaggatgacctgtcttacaaggacatcc <u><b>A</b></u> gc gTtGtttcgtggctaatagcaggatgacgacgataagtaggg <b>Austausch von C nach A</b>
En-passant Mutagenese	P522Q forward short	cctgCGGcaacgcaaggatg
En-passant Mutagenese	P522Q reverse	ctacctgggCGGccctCGGcattagccacgaaacaacgc <u><b>T</b></u> gg atGtCcttGtaagacaggTcaaccaattaaccaattctgattag <b>Austausch von G nach T</b>
En-passant Mutagenese	V715M forward long	gTttgagccCGaggTgggttactacaacgacCCCGTggcc <u><b>A</b></u> tgTtc gactTtgccagccttaaggatgacgacgataagtaggg <b>Austausch von G nach A</b>
En-passant Mutagenese	V715M forward short	gTttgagccCGaggTgggtt
En-passant Mutagenese	V715M reverse	ggGccatgatgatggaaggtagaggctggcaaagtCGaaca <u><b>T</b></u> ggccacggggTcgtTgtagTcaaccaattaaccaattctgattag <b>Austausch von nach C nach T</b>
Sequenzierung	p1up	tctttacgatCGGcacctgc
Sequenzierung	p1do	tcgtcgtacctttgctgtag
Sequenzierung	p2up	gtatctacacctcgtg
Sequenzierung	p2do	ccgtagaaagcgttgca

**Tabelle 4:** Verwendete Primer für die UL97-Region

	<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz 5' → 3'</b>
En-passant Mutagenese	C480F forward long	gaacccgcacaaccccagcgagatcgtgcgcgccgctgt <b>T</b> cg attacagcctcagcgagccaggatgacgacgataagtaggg <b>Austausch von G nach T</b>
En-passant Mutagenese	C480F forward short	gaacccgcacaaccccagcg
En-passant Mutagenese	C480F reverse	gctcgttgtaatccggatagggctcgtgaggctgtaatcg <b>A</b> acag cgcgcgcgcacgatctcaaccaattaaccaattctgattag <b>Austausch von nach C nach A</b>
En-passant Mutagenese	S512Stop forward long	ctttcaggagacgggtacggcgcgccgcatccccaactgct <b>A</b> gca ccgtctgcggaatgtaaggatgacgacgataagtaggg <b>Austausch von C nach A</b>
En-passant Mutagenese	S512Stop forward short	ctttcaggagacgggtacgg
En-passant Mutagenese	S512Stop reverse	tgggtcggaagcagggtgtaacattcgcgcgagacggtgc <b>A</b> ag cagttggggatgcgcgcgcaaccaattaaccaattctgattag <b>Austausch von G nach T</b>
En-passant Mutagenese	I429F forward long	cacagacatgtttcatcacgaccagtggaagctggcgtgc <b>T</b> tcgac agctaccgacgtgccttaggatgacgacgataagtaggg <b>Austausch von A nach T</b>
En-passant Mutagenese	I429F forward short	cacagacatgtttcatcacg
En-passant Mutagenese	I429F reverse	tagcgtcggccaacgtgcaaaaggcacgtcggtagctgtcga <b>A</b> g cacgccagcttccactggtcaaccaattaaccaattctgattag <b>Austausch von T nach A</b>
En-passant Mutagenese	L595S forward long	ggcgttgctcttaagcacgccggcgcgccctgccgcgct <b>C</b> gga gaacggtaagctcacgcaaggatgacgacgataagtaggg <b>Austausch von T nach C</b>

En-passant Mutagenese	L595S forward short	ggcgttgctctttaagcagc
En-passant Mutagenese	L595S reverse	gcagacagggcgtcggagcagtgcgtagcttaccgttctcc <b>G</b> acg cgcggcaggccgcgccggcaaccaattaaccaattctgattag <b>Austausch von nach A nach G</b>
Sequenzierung	405F	ctgctgcacaacgtcacggt
Sequenzierung	520mdo	gcatgggtcggaaagcagg
Sequenzierung	595F	cctcatgctggctgttgacc
Sequenzierung	595R	ccatgctcgcccaggagaca

### 2.1.10 Reagenzien für die Gelelektrophorese

- 10x TBE-Puffer (Roth)  
*Für die Gelelektrophorese wurde 1x TBE-Puffer verwendet*
- SeaKem LE Agarose (Lonza)
- Midori Green Advanced (Nippon Genetics Europe GmbH)
- 100 bp DNA-Leiter (Invitrogen)
- Gel Loading Dye Purple (6x) (Biolabs)

### 2.1.11 Reagenzien für den DNA-Verdau

- DpnI (New England Biolabs)
- CutSmart Puffer (New England Biolabs)

### 2.1.12 Reagenzien für Immunfluoreszenz

- Primäre Antikörper (Argene)
  - Anti-p72 (Immediate Early) Monoclonal IgG-Mouse Antibody (E13)  
*eingesetzt 1:1,000 in PBS*

- Anti-pp65 (Early-Late) Monoclonal IgG-Mouse Antibody (CINA-Pool)  
*eingesetzt 1:250 in PBS*
- Sekundäre Antikörper (Dianova)
  - Cy3-gelabelter Ziege-anti-Maus Antikörper  
*eingesetzt 1:300 in PBS*
- Aceton 80 % (Labochem international)
- Waschpuffer:
  - 1x Phosphatgepufferte Saline (DPBS) (Gibco)
  - +1 % FCS (Gibco)

### 2.1.13 Verbrauchsmaterial

- C-Chip (NanoEnTek)
- 2 mm Elektroporationsküvetten (Peqlab)
- 6-Well Platten (Greiner)
- 24-Well Platten (Greiner)
- 96-Well Platten (Greiner)
- 5 mm Polystyrol-Rundbodenröhrchen (Falcon)
- Kryotubes 2 ml (Greiner)
- Konische Zentrifugenröhrchen 15 ml; 50 ml (Falcon)
- Pipettenspitzen mit Filter 10-1,000 µl (Starlab)
- Pipettenspitzen ohne Filter 300 µl (Eppendorf)
- Reaktionsgefäße 0,2 ml; 0,5 ml (Sarstedt)
- Reaktionsgefäße 1,5 ml; 2,0 ml (Eppendorf)
- Spritzen 5 ml, 50 ml (Becton-Dickinson)
- Filter 0,22 µm (MillEx)
- Filter 0.45 µm (Sartorius)
- Stripetten 5 ml; 10 ml; 25 ml (Costar)
- Petri-Schalen (Multimed Biotech)
- Zellkulturflasche 25 cm<sup>2</sup> (Greiner)
- Zellkulturflasche 75 cm<sup>2</sup> (Greiner)

- Zellkulturflasche 175 cm<sup>2</sup> (Greiner)
- Drigalski-Spatel delta aus ABS (Neolab)

#### 2.1.14 Kits

- NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel)
- NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel)
- NucleoBond® Xtra Midi (Macherey-Nagel)
- Mammalian Transfection Kit (Stratagene)
  - *Lösung 1*: 2,5 M CaCl<sub>2</sub>
  - *Lösung 2*: 2x BBS, pH 6,95  
50 mM N, N-bis(2-hydroxyethyl)-2-Aminoethansulfonsäure  
Gepufferte Saline, 280 mM NaCl und 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
  - *Lösung 3*: 2 mg / ml DEAE-Dextran in 0,9 % NaCl
- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen)

#### 2.1.15 Kleingeräte

- Gelelektrophorese-Kammer (Hybaid)
- Spannungsquelle PowerPac 300 (Bio-Rad)
- Heizblock (Heidolph)
- Mikrowelle Micromat (AEG)
- Photometer (Eppendorf)
- Vortex (Heidolph)
- Thermomixer 5436 (Eppendorf)
- Pipettierhilfe Pipetboy acu (IBS)

#### 2.1.16 Großgeräte

- Axiovert200 Fluoreszenzmikroskop (Zeiss)
- Zentrifugen:
  - Eppendorf 5415D (Eppendorf)

- Eppendorf 5417R (Eppendorf)
- Megafuge® 10R (Heraeus)
- Rotina 48R (Hettich)
- Sicherheitswerkbank (BDK)
- CO<sub>2</sub>-Inkubator (Labotect, IBS)
- Invers-Mikroskop Axiovert 25 (Zeiss)
- Elektroporator: Gene Pulser Xcell (Biorad)
- Peltier Thermal Cycler 200 (MJ Research)
- Schüttler: Certomat (B. Braun Biotech International)
- UV-Transilluminator (Intas)
- Wasserbad (GFL)
- Autoklav: 2440ELV (Tuttnauer)
- Brutschrank: Kelvitron (Heraeus)

#### 2.1.17 Computerprogramme

- Microsoft Word (Version 2101)
- PowerPoint (Version 2101)
- EndNote (X9)
- GraphPad Prism (7)
- SPSS (Version 24)
- Chromas (Version 2.6.6)
- GIMP (2.10.8)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Übersicht

Der Vorteil der in dieser Arbeit verwendeten Methode der en-passant Mutagenese nach Tischer ist, dass einzelne Mutationen in das BAC-Genom eingebracht werden können, ohne dass Fremdsequenzen zurückbleiben (Tischer et al., 2010). Hierfür wurden zunächst PCR-Produkte hergestellt, die die erwünschte Punktmutation und ein Kanamycinresistenzgen enthielten. Diese PCR-Produkte wurden in das BAC des *E. coli* Stammes *GS1783/TB40-BACKL7-UL32EGFP* eingefügt. Die Kanamycinresistenz diente hierbei als positiver Selektionsmarker. Später konnte durch Zugabe von Arabinose, wie im Abschnitt 2.2.6 beschrieben, der positive Selektionsmarker wieder entfernt werden, sodass die Punktmutationen als einzige zusätzliche Modifikation des BACs verblieben. Mit einer Midipräparation wurde die Bacmid-DNA anschließend aus den Bakterien isoliert und auf HFF transfiziert. Mit den infizierten HFF wurden einerseits Ein-Schritt-Wachstumszyklen der einzelnen Mutationen durchgeführt, und andererseits Plaquereduktionsassays mit den Wirkstoffen Ganciclovir, Cidofovir und Foscarnet.

### 2.2.2 Generierung von PCR-Produkten mit definierten Punktmutationen

Als erster Schritt wurden PCR-Produkte, welche die gewünschte Punktmutation enthielten, hergestellt. Als Template dienten pEPkan-S Plasmide. Diese enthielten ein Kanamycin-Resistenzgen, welches später als positiver Selektionsmarker diente. Dem Kanamycin-Resistenzgen ging eine Erkennungssequenz für I-SceI, einer Endonuklease, welche über einen arabinoseinduzierten Promotor Doppelstrangbrüche einfügen kann, voraus. Dadurch konnte später das Kanamycin-Resistenzgen wieder entfernt werden.



In dem ersten PCR-Schritt wurde *der forward long* Primer und der Primer *universal Kan* verwendet. pEPkan-S musste in einer niedrigen Konzentration von 1 ng /  $\mu$ l verwendet werden, um später den vollständigen DpnI-Verdau der Templates zu ermöglichen. Die PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 100  $\mu$ l durchgeführt und es wurde der PCR-Mastermix „Pwo-Master“ von Roche benutzt.

Primer <i>forward long</i>	1 $\mu$ l
Primer <i>universal Kan</i>	1 $\mu$ l
pEPkan-S (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
$\Sigma$	100 $\mu$ l

Die PCR-Amplifikation erfolgte mit folgendem Programm:

Initiale Denaturierung: 95 °C 5 Minuten

*9 Zyklen*

Denaturierung: 95 °C 45 Sekunden

Annealing: 51 °C 2 Minuten

Elongation: 68 °C 2 Minuten

*24 Zyklen*

Denaturierung: 95 °C 45 Sekunden

Annealing: 60 °C 2 Minuten

Elongation: 68 °C 2 Minuten

Terminale Elongation: 68 °C 10 Minuten

Das PCR-Produkt wurde mit dem „NucleoSpin® Extract II“- Kit von Macherey-Nagel aufgereinigt. Dazu wurde es mit der doppelten Menge an Bindungspuffer gemischt, auf eine NucleoSpin® Säule geladen und danach für eine Minute mit 11000 rpm zentrifugiert. Danach wurde die Säule mit 600  $\mu$ l Waschpuffer gewaschen und erneut für eine Minute mit 11000 rpm zentrifugiert. Die Membran wurde für zwei Minuten durch Zentrifugation mit 11000 rpm getrocknet. Danach

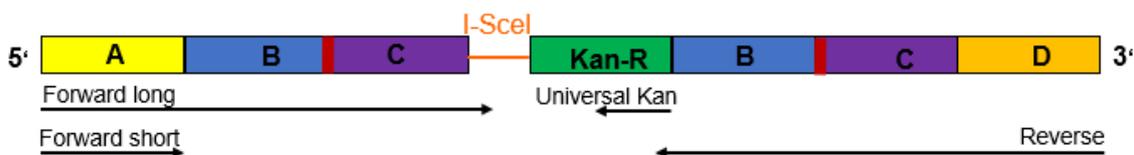
wurde das nun aufgereinigte PCR-Produkt in 50  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O eluiert. 1  $\mu\text{l}$  diente als Template für den zweiten PCR-Schritt, bei dem die homologe HCMV-Sequenz am 3'-Ende eingefügt wurde.

Auch die zweite PCR wurde in einem Endvolumen von 100  $\mu\text{l}$  durchgeführt und es wurde ebenfalls der PCR-Mastermix „Pwo-Master“ von Roche verwendet. Als Primer wurde der Primer *reverse* und der Primer *forward short* verwendet.

PCR-Produkt der vorherigen Runde	1 $\mu\text{l}$
Primer forward short	1 $\mu\text{l}$
Primer reverse	1 $\mu\text{l}$
ddH <sub>2</sub> O	47 $\mu\text{l}$
Pwo-Master	50 $\mu\text{l}$
$\Sigma$	100 $\mu\text{l}$

Das Amplifikationsprogramm war dasselbe, wie in der vorherigen Runde. Auch dieses PCR-Produkt wurde, wie bereits oben beschrieben, mit dem „NucleoSpin® Extract II“-Kit von Macherey-Nagel aufgereinigt und in 50  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O gelöst.

Alle PCR-Produkte wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt. Um die erfolgreiche PCR zu bestätigen, wurden jeweils 10  $\mu\text{l}$  des endgültigen PCR-Produktes auf Agarosegel geladen.



**Abbildung 9:** fertiges PCR-Produkt mit den dazugehörigen Primern. A, B, C, D sind homologe HCMV-Sequenzen, welche alle ca. 20 bp lang sind. I-SceI ist die Erkennungssequenz für I-SceI, Kan-R das Kanamycinresistenzgen. In Rot ist die jeweilige Punktmutation gekennzeichnet.

### 2.2.3 Gelelektrophorese, um den Erfolg der Mutagenese-PCR zu bestätigen

Die Erfolgskontrolle der Mutagenese-PCR erfolgte über eine Gelelektrophorese mit 1 % Agarosegel. 0,5 g Agarose wurde in 50 ml 1xTBE-Puffer gelöst und in

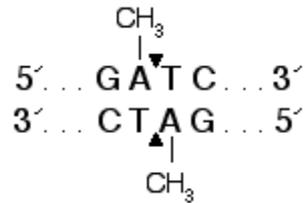
der Mikrowelle so lange erhitzt, bis keine Flocken mehr sichtbar waren. Zur DNA-Visualisierung wurden 2 µl Midori-Green hinzugefügt. 10 µl PCR-Produkt wurden nun mit 2 µl Purple Ladebuffer gemischt und auf das Gel aufgetragen. Um die Länge der PCR-Fragmente kontrollieren zu können, wurde zudem eine 100 bp DNA-Leiter, die ebenfalls mit 2 µl Purple Ladebuffer gemischt wurde, aufgetragen. Die Gel-Elektrophorese erfolgte bei 100 Volt für 30 bis 45 Minuten und die Kontrolle erfolgte unter UV-Licht.

#### **2.2.4 PCR-Aufreinigung und DpnI-Verdau, um die übrig gebliebenen Templates zu entfernen**

Um sicherzugehen, dass tatsächlich nur die PCR-Produkte mit den gewünschten Punktmutationen und nicht auch pEPkan-S-Templates später in die *E. coli* Bakterien eingefügt wurden, mussten die übrig gebliebenen Templates vor der Mutagenese entfernt werden. Später wären ansonsten *E. coli* mit mutierter Bacmid-DNA nicht von denen mit Wildtyp-Bacmid-DNA unterscheidbar gewesen, da in beiden das Kanamycinresistenzgen enthalten gewesen wäre. Um dies zu verhindern, erfolgte ein DpnI-Verdau. Bei DpnI handelt es sich um ein Methylation-sensitives Restriktionsenzym, welches nur methylierte DNA schneidet, also in diesem Fall nur die Template-DNA. Das PCR-Produkt bleibt dabei unbeschadet. Der DpnI-Verdau wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt:

PCR-Produkt:	42 µl
CutSmart:	5 µl
DpnI:	3 µl
<hr/>	
Σ	50 µl

Das Gemisch wurde für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend erneut mit dem „NucleoSpin® Extract II“-Kit von Macherey-Nagel aufgereinigt. Am Ende wurde die DNA in 15 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.



**Abbildung 10:** Erkennungsstelle für DpnI, Abbildung mit freundlicher Genehmigung von New England Biolabs (New England Biolabs).

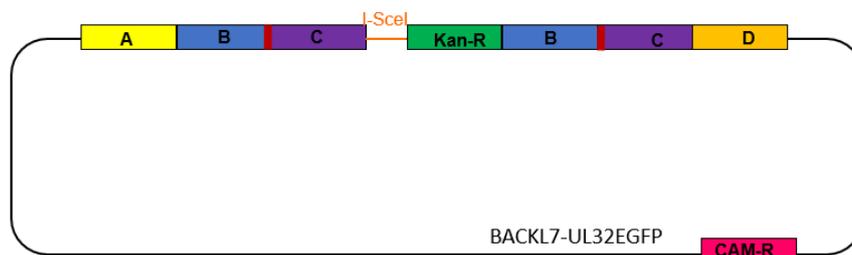
### 2.2.5 Generierung elektrokompetenter *E. coli* GS1783 und BAC-Mutagenese

Der *E. coli* Stamm GS1783 beinhaltet das HCMV-BAC, in dessen BAC-Kassette sich ein Chloramphenicolresistenzgen befindet. In den *E. coli* Stamm wurde außerdem ein defekter  $\lambda$  Prophage integriert, über den das Red-System eingefügt wurde. Hierdurch konnte das lineare PCR-Produkt in die Zielsequenz des HCMV-BACs eingefügt werden. Das Red-System besteht aus drei Komponenten. Bei Red $\alpha$  handelt es sich um eine Exonuklease, Red $\beta$  bindet an der Einzelstrang-DNA, schützt sie vor weiterer Degradation und fördert die Annäherung an die Zielsequenz. Auch Red $\gamma$  schützt vor weiterer Degradation.

10 ml LB-Medium wurden zusammen mit 25  $\mu$ l Chloramphenicol und dem *E. coli* Stamm GS1783 / TB40-BACKL7-UL32EGFP inokuliert und über Nacht bei 32 °C und 160 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden 50 ml LB-Medium mit 125  $\mu$ l Chloramphenicol und 1 ml der Übernachtskultur für weitere drei Stunden bei 32 °C und 160 rpm in einem Erlenmeyerkolben inkubiert. Anschließend wurde die Kultur in einem vorgeheizten Wasserbad für exakt 15 Minuten bei 42 °C inkubiert. Durch den Temperaturanstieg werden die Red-Gene exprimiert. Die Bakterien wurden dann in ein vorgekühltes Falcon Röhrchen überführt und für 30 Minuten auf Eis gestellt. Die Elektroporationsküvetten, das PCR-Produkt, Pipetten und ddH<sub>2</sub>O wurden ebenfalls auf dem Eis platziert. Um die Bakterien von verbleibendem Nährmedium zu befreien, wurden sie mit 4000 rpm bei 4 °C für zehn Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in einem Eisbad in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert und anschließend mit 50 ml eisgekühltem destilliertem Wasser aufgefüllt und erneut mit 4000 rpm

bei 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zwei bis drei Mal wiederholt, um sicherzugehen, dass kein Salz des Nährmediums verblieb. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand erneut verworfen und die Bakterien in dem verbleibenden Wasser resuspendiert.

100 µl der Bakterien wurden zusammen mit 15 µl des PCR-Produktes in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben und die Bakterien mit 2500V, 15µF und 200 Ω elektroporiert. Direkt anschließend wurde 1 ml 32 °C warmes SOC-Medium zu den Bakterien gegeben und alles in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß transferiert. Das Eppendorfgefäß wurde nun für 1,5–2 h bei 32 °C und 160 rpm inkubiert. Danach wurden die Bakterien mit 6000 rpm für 30 Sekunden zentrifugiert und 800 µl des Überstandes entfernt. Das Pellet wurde in der verbleibenden Lösung resuspendiert und die Bakterienlösung auf zwei LB-Platten, die Chloramphenicol (25 µl / ml) und Kanamycin (50 µl / ml) enthielten, verteilt. Die Platten wurden über Nacht bei 32 °C inkubiert. Es erfolgte die Selektion über die Kanamycinresistenz.



**Abbildung 11: BAC-Mutagenese:** Durch Erwärmen auf 42 °C wurden die Red-Rekombinaseenzyme induziert und das PCR-Produkt nach Elektroporation in einem ersten Rekombinaseschritt in die Bacmid-DNA integriert. Über den positiven Selektionsmarker, das Kanamycinresistenzgen (Kan-R), ließen sich Bakterien, die das PCR-Produkt aufgenommen hatten, identifizieren. In der BAC-Kassette befand sich außerdem ein Chloramphenicolresistenzgen (CAM-R).

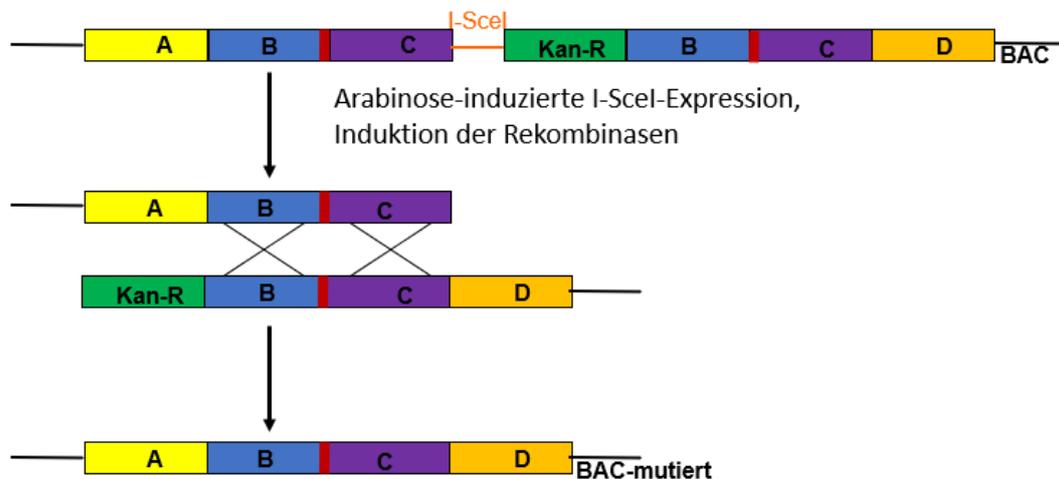
### 2.2.6 Entfernung des positiven Selektionsmarkers (Kanamycinresistenzgen)

Im zweiten Schritt der en-passant Mutagenese wurde der positive Selektionsmarker, das Kanamycin-Resistenzgen, wieder entfernt. Hierfür wurden vier Kolonien ausgesucht, jeweils mit 1 ml LB und 2,5 µl Chloramphenicol

inokuliert und über Nacht bei 32 °C und 160 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde 2 ml LB mit 5 µl Chloramphenicol und 100 µl der Übernachtskultur versetzt und für zwei Stunden bei 32 °C und 160 rpm inkubiert.

Ein Arabinosestock wurde wie folgt hergestellt:

2 g Arabinose wurde mit 10 ml ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt und sterilfiltriert. 0,5 ml Arabinoselösung wurde mit 9,5 ml LB-Medium und 25 µl Chloramphenicol vermischt, sterilfiltriert und auf 32 °C vorgewärmt. 2 ml Arabinosestock wurde zu der Bakterienkultur gegeben und für exakt 30 Minuten bei 32 °C inkubiert. Die Arabinose induzierte die Expression des I-SceI-Enzyms und die DNA wurde an den I-SceI-Erkennungssequenzen geschnitten. Durch anschließendes Inkubieren der Kultur für exakt 15 Minuten bei 42 °C wurde erneut das Red-Rekombinase-Protein induziert und dies führte zur homologen Rekombination zwischen den identischen HCMV-Sequenzen, die sich auf beiden Seiten des Kanamycin-Resistenzgenes befunden hatten. Dadurch wurde das HCMV-BAC wieder rezirkularisiert und die Punktmutation verblieb als einzige Modifikation des HCMV-BACs. Danach wurde die Kultur bei 32 °C für zwei Stunden belassen und anschließend 0,5 µl Bakterien mit 5 ml LB-Medium verdünnt. 100 µl davon wurden auf frisch hergestellte LB-Platten, die Chloramphenicol (25 µl / ml) und 1 % Arabinose enthielten, gegeben und die Platten über Nacht bei 32 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden durch negative Selektion diejenigen Kulturen isoliert, bei denen die Entfernung des Kanamycin-Resistenzgens erfolgreich gewesen war. Hierfür wurden 12 Kolonien gepickt und in jeweils 20 µl LB-Medium resuspendiert. Je 10 µl davon wurde auf ein Feld einer LB Platte mit Chloramphenicol (25 µl / ml) und Kanamycin (50 µl / ml) aufgebracht und die anderen 10 µl auf eine LB-Platte nur mit Chloramphenicol (25 µl / ml), aber ohne Kanamycin. Die Platten wurden erneut über Nacht bei 32 °C inkubiert. Am nächsten Tag konnten die Kolonien bestimmt werden, bei denen das Kanamycin-Resistenzgen erfolgreich entfernt wurde. Bei Kolonien, die auf der Platte mit Chloramphenicol gewachsen waren, aber nicht in Anwesenheit von Kanamycin, konnte der positive Selektionsmarker erfolgreich entfernt werden.



**Abbildung 12:** Durch die Zugabe von Arabinose wurde die Expression von I-SceI induziert, das BAC an der abgebildeten Erkennungssequenz geschnitten und linearisiert. Durch Erwärmen auf 42 °C wurden die Red-Rekombinaseenzyme induziert und es erfolgte die zweite homologe Rekombination, in der der positive Selektionsmarker (Kan-R) entfernt wurde. Somit blieb die Punktmutation, hier in Rot abgebildet, die einzige Modifikation in der Bacmid-DNA.

### 2.2.7 Minipräparation der BAC-DNA zur späteren Erfolgskontrolle

Ein weiterer Kontrollschritt, um den Erfolg der en-passant-Mutagenese zu überprüfen, war die Sequenzierung der Bacmid-DNA. Hierfür wurde mit Hilfe des NucleoSpin® Plasmid Kits von Macherey-Nagel eine Minipräparation durchgeführt. Zunächst wurde jeweils eine *E. coli* Kolonie, bei der das Kanamycin-Gen erfolgreich entfernt wurde, mit 5 ml LB und 12,5 µl Chloramphenicol über Nacht bei 32 °C inkubiert. Die Bakterien wurden dann mit 4000 rpm zehn Minuten lang zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde dann mit 500 µl Resuspensionspuffer des Kits resuspendiert. Dann wurde 500 µl Lysepuffer hinzugegeben und das Ganze durch 6-8-maliges Invertieren gemischt. Die Lösung wurde dann fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, sodass die alkaline Lyse und Denaturierung der Bakterien stattfinden konnte. Anschließend wurde 600 µl Neutralisationspuffer hinzugegeben und das Falcon Röhrchen erneut 6-8-mal invertiert. Das Lysat wurde nun mit 4000 rpm zehn Minuten bei Raumtemperatur geklärt. Um die DNA zu

binden, wurde eine NucleoSpin®Plasmid Säule benutzt. Diese wurde in einem 2 ml Reaktionsgefäß platziert und jeweils 750 µl Überstand auf die Säule geladen. Diese wurde dann für eine Minute mit 11000 x g zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und alles wiederholt, bis der gesamte Überstand aus dem Vorschritt aufgebraucht war. Um die DNA enthaltende Silikonmembran der Säule zu waschen, wurde anschließend 600 µl Waschpuffer des Kits auf die Säule gegeben und mit 11000 x g für eine Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule wieder in dem Sammelröhrchen platziert. Die Membran wurde mit 11000 x g für zwei Minuten getrocknet und die Säule in einem neuen 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen platziert. Die DNA wurde mit 70 °C warmem, destilliertem Wasser für zwei Minuten bei 70 °C inkubiert und dann für eine Minute mit 11000 x g zentrifugiert. Die isolierte DNA wurde bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 2.2.8 Kontrolle der erfolgreichen Mutagenese durch Sequenzierung des UL54- und des UL97-Gens

Die Abschnitte der UL54 oder UL97 Region, in die die Mutation eingefügt wurde, wurden anschließend sequenziert, um den Erfolg der Mutagenese zu kontrollieren. Um den Abschnitt zu vervielfältigen, wurde eine PCR durchgeführt. Die verwendeten Sequenzierungsprimer sind in Tabelle 3 und 4 aufgelistet.

Jede PCR-Reaktion hatte die folgende Zusammensetzung:

Extrahierte DNA	5 µl
Primer <i>forward</i>	1 µl
Primer <i>reverse</i>	1 µl
Pwo-Master	25 µl
Ad ddH <sub>2</sub> O	18 µl
<hr/> $\Sigma$	<hr/> 50 µl

Die PCR-Amplifikation erfolgte mit dem folgenden Programm:

Initiale Denaturierung 98 °C 30 Sekunden

*35 Zyklen*

Denaturierung 98 °C 7 Sekunden

Annealing 52 °C 30 Sekunden

Elongation 72 °C 1 Minute

Finale Elongation 72 °C 10 Minuten

Kühlen 20 °C 1 Minute

Die Aufreinigung des PCR-Produkts erfolgte mit dem „NucleoSpin Extract II“-Kit von Macherey-Nagel, anschließend wurde es in 50 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst und das erfolgreiche PCR-Produkt auf einem 1 % Agarose-Gel überprüft.

Zu 5 µl des PCR Produkts wurde anschließend 5 µl des jeweils zugehörigen Primer *forward* (10 pmol) gegeben. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma GATC Biotech (Konstanz) und die Sequenz wurde mit dem Programm Chromas kontrolliert.

### **2.2.9 Midipräparation, um rekombinantes zirkuläres HCMV-Genom für die Transfektion zu erhalten**

Nachdem die erfolgreiche Mutagenese durch die Sequenzierung bestätigt wurde, musste Bacmid-DNA für die Transfektion hergestellt werden. Hierzu erfolgte eine Midipräparation der erfolgreichen Kolonie mithilfe des "NucleoBond® Xtra Midi"-Kits von Macherey-Nagel. 200 ml LB-Medium wurden mit 500 µl Chloramphenicol und der Kolonie über Nacht bei 37 °C und 160 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Gemisch bei 4 °C mit 4000 x g für 15 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde dann mit 16 ml Resuspensionspuffer vollständig resuspendiert. Anschließend wurde 16 ml Lysepuffer hinzugegeben und das Ganze durch fünfmaliges vorsichtiges Invertieren vermischt und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Eine NucleoBond® Xtra Column wurde

vorbereitet, indem 12 ml Equilibrationspuffer vorsichtig auf den Rand des Filters gegeben wurden, sodass der gesamte Filter benetzt wurde. Nach der fünfminütigen Inkubationszeit wurden 16 ml Neutralisationspuffer zu dem Gemisch gegeben und die Lösung so lange invertiert, bis die zuvor blaue Lösung komplett farblos war. Das Lysat wurde nun vorsichtig auf den Filter geladen und der Filter anschließend mit 5 ml Equilibrationspuffer gewaschen. Anschließend wurde der Filter verworfen. Die Säule wurde nun mit 8 ml Waschpuffer gewaschen und die DNA mit 5 ml Elutionspuffer gelöst. Das Elutat wurde mit 3,5 ml Isopropanol vermischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 4000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden 2 ml Ethanol zu dem Pellet gegeben und bei Raumtemperatur mit 4000 x g für 15 Minuten zentrifugiert. Der Ethanolüberstand wurde vorsichtig abpipettiert und das Pellet 10-15 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und dann in 100 µl ddH<sub>2</sub>O aufgelöst. Der DNA-Gehalt wurde mittels Photometrie bestimmt. Hierzu wurde 1 µl DNA mit 99 µl ddH<sub>2</sub>O verdünnt und die Konzentration bei 260 nm gemessen. Die Transfektion erfolgte am nächsten Tag.

#### **2.2.10 Zellkultur humaner Vorhautfibroblasten und humaner retinaler Pigmentepithelzellen**

Humane Vorhautfibroblasten wurden in 2 ml Kryotubes bei -80 °C gelagert. Für eine Zellkultur wurde ein Kryotube bei Raumtemperatur aufgetaut und in ein 15 ml Falcon mit 10 ml MEM + 1 % P / S + 5 % FCS überführt und anschließend für fünf Minuten mit 1700 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 5 ml MEM + 1 % P / S + 5 % FCS gelöst und in eine 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt. Alle Zellen wurden grundsätzlich bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Sobald die Zellen einen konfluenten Zellrasen gebildet hatten, wurde das Nährmedium verworfen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Um die Zellen vom Flaschenboden zu lösen, wurden sie bei 37 °C für fünf Minuten mit 2 ml Trypsin inkubiert. Indem 2 ml MEM + 1 % P/S + 5 % FCS zu der Lösung gegeben wurden, wurde die Reaktion gestoppt. Anschließend wurde die Suspension in ein 50ml Falcon überführt und für fünf Minuten mit 1700 x g

zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 20 ml MEM +1 % P / S + 5 % FCS gelöst und in eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt. Sobald ein konfluenter Zellrasen gewachsen war, wurden die Zellen dann in eine 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt und danach 1:2 gesplittet.

Retinale Pigmentepithelzellen (ARPE-19) wurden wie HFF gelagert und behandelt, mit dem Unterschied, dass sie 1:4 gesplittet wurden.

### **2.2.11 Transfektion der Bacmid-DNA in HFF**

Für jede Mutation wurde stets ein getrennter Doppelansatz durchgeführt. Am Vortag der Transfektion wurden in 2 Wells einer 6-Well-Platte 300.000 HFF/Well ausgesät und über Nacht inkubiert. Für die Transfektion wurde das Stratagene Mammalian Transfection Kit verwendet. Für jeden Ansatz wurden in einem 3,5 ml Sarstedt-Röhrchen 3 µg BAC-DNA und 5 µl Herring Sperma DNA 1 µg / µl vermischt und mit destilliertem Wasser auf 75 µl aufgefüllt. Hierbei wurden stets geschnittene Pipettenspitzen verwendet, um die DNA zu schonen. Anschließend wurden 8,3 µl Lösung 1 des Kits hinzugegeben und durch sanftes Klopfen vermischt. Nun wurde tropfenweise 83,3 µl Lösung 2 des Kits hinzugegeben und erneut durch sanftes Klopfen vermischt. Das Gemisch wurde 25 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde das MBS-Medium vorbereitet, indem 940 µl MEM mit 60 µl Lösung 3 des Kits vermischt wurde. Die HFF wurden einmal mit PBS gewaschen und 430 µl MBS-Medium in das Reaktionsröhrchen gegeben und zweimal auf und ab pipettiert. Dann wurde die Reaktionslösung tropfenweise auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden nun für 2–2,5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Glycerol-Schock-Lösung wurde währenddessen auf Eis vorgekühlt. Anschließend wurde die DNA-Lösung von den Zellen genommen und 1 ml Glycerol-Schock-Lösung für exakt 30 s auf die Zellen gegeben. Sofort wurden dann 3 ml MEM +5 % FCS +1 % P / S hinzugegeben, alles abgesaugt und zweimal mit MEM + 5 % FCS +1 % P / S gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen mit 3 ml MEM +5 % FCS + 1 % P / S inkubiert und sobald ein konfluierender Zellrasen erreicht war, in eine 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt. 1-2 Wochen

nach Transfektion konnte meistens erste Plauebildung beobachtet werden. Sobald circa 90 % der Zellen einen zytopathischen Effekt aufwiesen, wurde eine 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche HFF mit 1 ml Virusüberstand inkubiert und 3 weitere Milliliter bei -80 °C eingefroren. Nach ungefähr drei Passagen wurden aus dem Virusüberstand mit Hilfe des QIAamp DNA Blood Mini-Kit von Qiagen virale DNA isoliert und erneut sequenziert, um das Vorhandensein der gewünschten Mutation zu beweisen, beziehungsweise unerwünschte Basenpaaränderungen auszuschließen.

### **2.2.12 Sequenzierung des Virenüberstands**

Um das Vorhandensein der gewünschten Punktmutation zu beweisen, beziehungsweise um unerwünschte Basenpaaränderungen auszuschließen, wurde der Virusüberstand erneut sequenziert. Dies erfolgte mit dem QIAamp DNA Blood Mini-Kit von Qiagen. Hierfür wurden 20 µl Proteinase K des Kits in ein 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen gegeben. Dazu kamen 200 µl des jeweiligen Virenüberstandes und 200 µl AL-Puffer des Kits. Durch Pulsationsvortexen für 15 Sekunden wurde alles vermischt und bei 56 °C für zehn Minuten inkubiert. Durch kurze Zentrifugation des Mikrozentrifugenröhrchens wurde erreicht, dass keine Tropfen am Deckel zurückblieben. Nach Zugabe von 200 µl Ethanol und erneutem Pulsationsvortexen für 15 Sekunden wurde erneut kurz zentrifugiert. Anschließend wurde das Gemisch auf eine QIAamp Mini Spin Säule geladen und eine Minute lang mit 8000 rpm zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen. 500 µl AW1-Puffer wurden auf die Säule geladen, erneut eine Minute lang mit 8000 rpm zentrifugiert und das Filtrat wieder verworfen. 500 µl AW2-Puffer wurden auf die Säule geladen und drei Minuten lang mit 14000 rpm zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und erneut eine Minute lang mit 14000 rpm zentrifugiert. 200 µl ddH<sub>2</sub>O wurde direkt auf den Filter gegeben und eine Minute lang bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde eine Minute mit 8000 rpm zentrifugiert. Um die gewünschten DNA-Abschnitte zu amplifizieren, erfolgte eine PCR wie im Abschnitt 2.2.8 beschrieben und auch diese Sequenzierung erfolgte durch die Firma GATC Biotech (Konstanz).

### 2.2.13 Bestimmung des Virustiters durch Bestimmung der Multiplicity of Infection (MOI) und TCID<sub>50</sub>-Assay (Tissue Culture Infective Dose)

Für die anschließenden Versuche musste die Virusmenge in dem Virusüberstand bestimmt werden. Dies geschah über die sogenannte Multiplicity of Infection (MOI), welche über Verdünnungsreihen das Verhältnis von Viruspartikel zu Zellen bestimmt. Das Assay wurde in einer 96-Well-Platte durchgeführt. In einem Volumen von 100 µl / Well wurden in jedes Well 10.000 HFF ausgesät und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurde ein Aliquot Virusüberstand aufgetaut und in Verdünnungsstufen von 10<sup>-1</sup> bis 10<sup>-6</sup> mit DMEM verdünnt. 100µl jeder Verdünnung wurde, wie in Abbildung 13 dargestellt, auf jedes Well gegeben. Danach wurden die Zellen 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Der Überstand wurde dann verworfen und die Zellen mit 80 % Aceton für fünf Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurden sie dreimal mit PBS gewaschen. Infizierte Zellen konnten über die HCMV IE-Proteine aufgezeigt werden, und zwar mit dem primären Antikörper HCMV I.E.A. mononukleärer IgG Maus-Antikörper (1:500 in PBS). Das PBS wurde von den Zellen entfernt und je 100 µl primärer Antikörper pro Well hinzugegeben und bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Der primäre Antikörper wurde dann entfernt und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Der primäre Antikörper wurde über den sekundären Antikörper Cy3-gelabelter Ziege-Anti-Maus (1:300 in PBS) sichtbar gemacht. Hierzu wurden 100 µl sekundärer Antikörper pro Well hinzugegeben und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Der sekundäre Antikörper wurde verworfen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend jedes Well mit 200 µl PBS aufgefüllt. Mit einem Axiovert200 Immunfluoreszenzmikroskop wurde der Virustiter bestimmt, indem in jedem Well nach IE-positiven Zellen gesucht wurde. Bei der höchsten Verdünnung, bei der noch infizierte Zellen sichtbar waren, wurden alle positiven Zellen gezählt. Die Bestimmung der MOI erfolgte mit der folgenden Formel:

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

Die Anzahl der Zielzellen in einem Well war 10.000. Wenn also zum Beispiel die Anzahl der infizierten Zellen bei einer Verdünnung von 10<sup>-4</sup> zwei gewesen wären, hätte sich die MOI wie folgt berechnet: 10<sup>4</sup> \* 2 / 10<sup>4</sup> = 2.

Mit demselben Assay konnte auch die TCID<sub>50</sub> (Tissue Culture Infective Dose 50) bestimmt werden. Diese bestimmt die Menge an Virus, bei der 50 % der Zellen infiziert werden.

Anders als bei Bestimmung der MOI wurde bei der TCID<sub>50</sub> nicht die Anzahl der IE-positiven Zellen gezählt, sondern ein Well als positiv gewertet, sobald IE-positive Zellen zu sehen waren. Hierbei werden Wells ab der Verdünnung, bei der alle Wells positiv sind, bis zu der Verdünnung, bei der kein Well mehr positiv ist, betrachtet.

Nach der Methode nach Spearman und Kärber (Hierholzer and Killington, 1996) bestimmte sich die TCID<sub>50</sub> :

$$\log_{10} \text{TCID}_{50} = x_0 - \frac{d}{2} + d \frac{\sum r_i}{N}$$

$x_0$  = log<sub>10</sub> des Kehrwerts der höchsten Verdünnung, bei der noch alle Wells positiv waren

$d$  = log<sub>10</sub> des Verdünnungsfaktors

$N$  = Wells pro Verdünnungsstufe

$\sum r_i$  = alle positiven Wells von der Verdünnungsstufe, bei der noch alle Wells positiv waren, bis zu der Verdünnungsstufe, bei der keine Wells mehr positiv waren.

In jedem Well waren 100 µl, also musste log<sub>10</sub> (TCID<sub>50</sub>) / 100 µl noch mit 10 multipliziert werden um log<sub>10</sub> (TCID<sub>50</sub>) / ml zu erhalten.

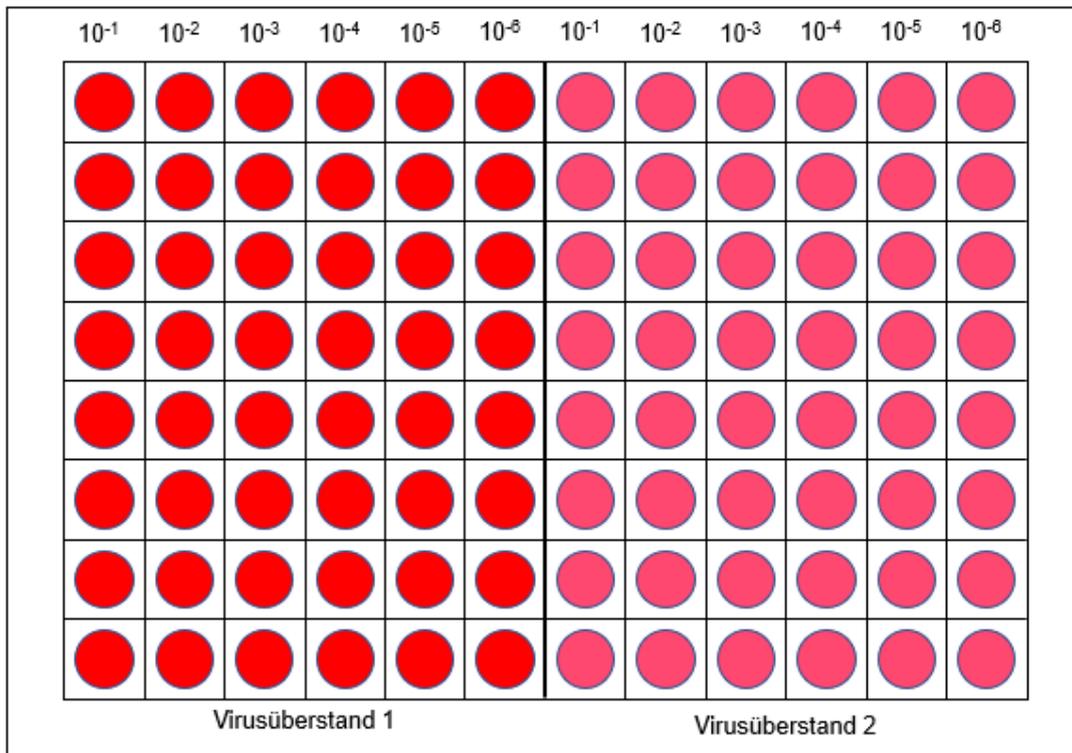
Im folgenden Beispiel soll die Berechnung verdeutlicht werden:

Verdünnung	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
Wells positiv	8 / 8	8 / 8	4 / 8	4 / 8	0 / 8	0 / 8

Die höchste Verdünnungsstufe mit 100 % infizierten Wells ist -2, die Gesamtanzahl positiver Wells zwischen der Verdünnung, bei der noch alle Wells positiv sind (10<sup>-2</sup>), bis zu der Verdünnung, bei der kein Well mehr positiv war (10<sup>-5</sup>), beträgt 16 und die Anzahl an Wells pro Verdünnungsstufe 8.

$$\frac{\log_{10} (\text{TCID}_{50})}{100\mu\text{l}} = 2 - \frac{1}{2} + 1 \frac{16}{8} = 3,5 \text{ ergibt pro Milliliter}$$

$$\frac{\log_{10} (\text{TCID}_{50})}{\text{ml}} = 4,5$$



**Abbildung 13:** Verdünnungsschema, um MOI und  $\log_{10}(\text{TCID}_{50})$  des Virusüberstands zu bestimmen. In jedem Well befanden sich  $10^4$  HFF, jedes wurde mit  $100 \mu\text{l}$  Virusverdünnung inokuliert.

#### 2.2.14 Phänotypische Charakterisierung der rekombinanten HCMV-Stämme mittels Wachstumsversuchen

Bei TB40/E aus dem BAC HCMV-TB40-BACKL7-UL32EGFP handelt es sich um einen Laborstamm, der an Zellkulturen adaptiert ist. Dadurch werden Viruspartikel in den Überstand exprimiert, wodurch die Wachstumsversuche ausschließlich aus dem Virusüberstand durchgeführt werden konnten.

Das Wachstumsverhalten der einzelnen Mutationen wurde über Analyse eines Ein-Schritt-Wachstumszyklus beobachtet und mit dem Referenzstamm HCMV-TB40-BACKL7-UL32EGFP verglichen. Dafür war eine hohe MOI von 1 nötig, um sicherzugehen, dass alle Zellen gleichzeitig infiziert wurden. Dadurch wurde erreicht, dass der Virusgehalt im Überstand nur aus einem Wachstumszyklus stammte, und diese Viren nicht neue Zellen infizieren konnten. Für das Assay

wurden  $1 \cdot 10^5$  HFF / Well auf 6-Well-Platten gesät und bei 37 °C über Nacht inkubiert, um zu erreichen, dass alle Zellen auf dem Boden adhären konnten. Am nächsten Tag wurde der Überstand von allen Wells entfernt und alle mit jeweils 1 ml Viruslösung von rekombinantem HCMV, welche auf eine MOI von 1 verdünnt wurde, infiziert. Zusätzlich wurden 1 ml Viruslösung bei -80 °C eingefroren. Vier Stunden nach der Infektion wurde der Virusüberstand entfernt, erneut 1 ml bei -80 °C eingefroren und die Zellen einmal mit PBS gewaschen und 1 ml frisches Wachstumsmedium auf jedes Well gegeben. Täglich, an insgesamt acht aufeinanderfolgenden Tagen, wurde nun der Überstand von einem Well aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. Insgesamt wurden pro Mutation drei Wachstumskurven erstellt, indem die  $\log_{10}$  (TCID<sub>50</sub>)-Werte gegen die Zeit aufgetragen wurden.

### **2.2.15 Phänotypische Charakterisierung der rekombinanten HCMV-Stämme durch Plaque-Reduktions-Assays**

Um herauszufinden, welche Mutationen Resistenzen gegen Ganciclovir, Cidofovir oder Foscarnet auslösen, wurden Plaque-Reduktions-Assays (PRA) durchgeführt. Hierfür wurden die Virostatika wie folgt mit MEM verdünnt:

GCV: 100; 50; 20; 10; 5; 1 µM

CDV: 20; 10; 2; 1; 0,4; 0,2 µM

FOS: 1000; 800; 600; 400; 200; 100 µM

Da jeweils 100 µl Virostatikalösung mit 100 µl Zelllösung inkubiert wurden, waren die finalen Konzentrationen:

GCV: 50; 25; 10; 5; 2,5; 0,5 µM

CDV: 10; 5; 1; 0,5; 0,2; 0,1 µM

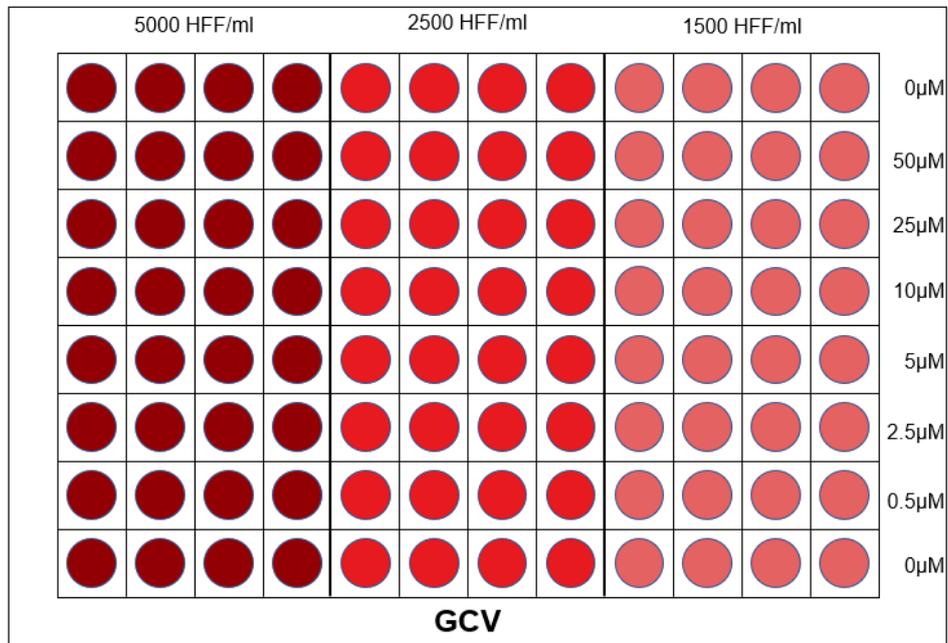
FOS: 500, 400, 300, 200, 100, 50 µM

HFF, die einen konfluenten Zellrasen in einer 75 cm<sup>2</sup> -Zellkulturflasche gebildet hatten, wurden mit rekombinantem HCMV infiziert und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, bis 80 – 90 % einen zytopathischen Effekt aufwiesen. Die infizierten Zellen wurden abtrypsinisiert, gezählt und auf  $5 \cdot 10^4$  Zellen / ml verdünnt. Aus diesen Zellen wurde eine Verdünnungsreihe von 5000, 2500 und 1500 Zellen / ml

hergestellt. Gleichzeitig wurden ARPE-19 Zellen abtrypsinisiert, gezählt und auf  $3 \cdot 10^5$  Zellen / ml verdünnt. In einem Verhältnis von 1:1 wurden ARPE-19 Zellen zu jeder HFF-Verdünnung gegeben, und wie im Schaubild unten gezeigt, wurden 100  $\mu$ l jeder Zelllösung in ein Well einer 96-Well-Platte gegeben. Jeweils vier Reihen wurden für eine Verdünnungsstufe genutzt. Direkt, nachdem die Zellen auf die 96-Well-Platte gegeben worden waren, wurden die unterschiedlichen Verdünnungen der Virostatika (jeweils 100  $\mu$ l / Well) auf die Zellen gegeben. In die erste und letzte Reihe wurde als Referenz nur Wachstumsmedium ohne Virostatikum gegeben. Das Assay wurde für sieben Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Zellen mit 80 % Aceton für fünf Minuten fixiert und permeabilisiert. Um die infizierten Zellen darzustellen, wurde der Antikörper HCMV anti-pp65, mononukleärer IgG-Mausantikörper (1:250 in PBS), gegen das virale Tegmentum Protein pp65 genutzt. In jedes Well wurden 100  $\mu$ l gegeben und die Zellen bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Danach wurde der primäre Antikörper verworfen und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Wie auch schon bei dem TCID<sub>50</sub>-Assay wurde auch hier der primäre Antikörper mit dem sekundären Antikörper Cy3- gelabelter Ziege-anti-Maus (1:300 in PBS), 100  $\mu$ l / Well sichtbar gemacht. Auch hier wurden die Zellen mit dem sekundären Antikörper für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Auch der zweite Antikörper wurde verworfen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde auf jedes Well 200  $\mu$ l PBS gegeben. Mit einem Axiovert200 Immunfluoreszenzmikroskop wurden die Assays ausgewertet. Hierfür wurden manuell die Plaques gezählt, die sich in jeder Virostatikaverdünnung gebildet hatten. Eine Plaque ist definiert als mindestens fünf infizierte benachbarte Zellen. Nicht alle drei HFF-Verdünnungen, die sich auf der 96-Well-Platte befanden, wurden ausgewertet, sondern nur die Verdünnung, bei der sich in der Referenzreihe 60-80 Plaques geformt hatten.

Die Effektive Dosis 50 (EC<sub>50</sub>) ist definiert als diejenige Konzentration von Virostatikum, bei der das Viruswachstum um 50 % reduziert werden konnte. Die Evaluation erfolgte mit dem Programm SPSS über die Probit Analyse. Die EC<sub>50</sub> jedes rekombinanten HCMV Stammes wurde mit der EC<sub>50</sub> des Referenzstammes

HCMV-TB40-BACKL7-UL32EGFP verglichen. Resistenz ist definiert als ein Verhältnis von  $\geq 2$  (Lurain and Chou, 2010).

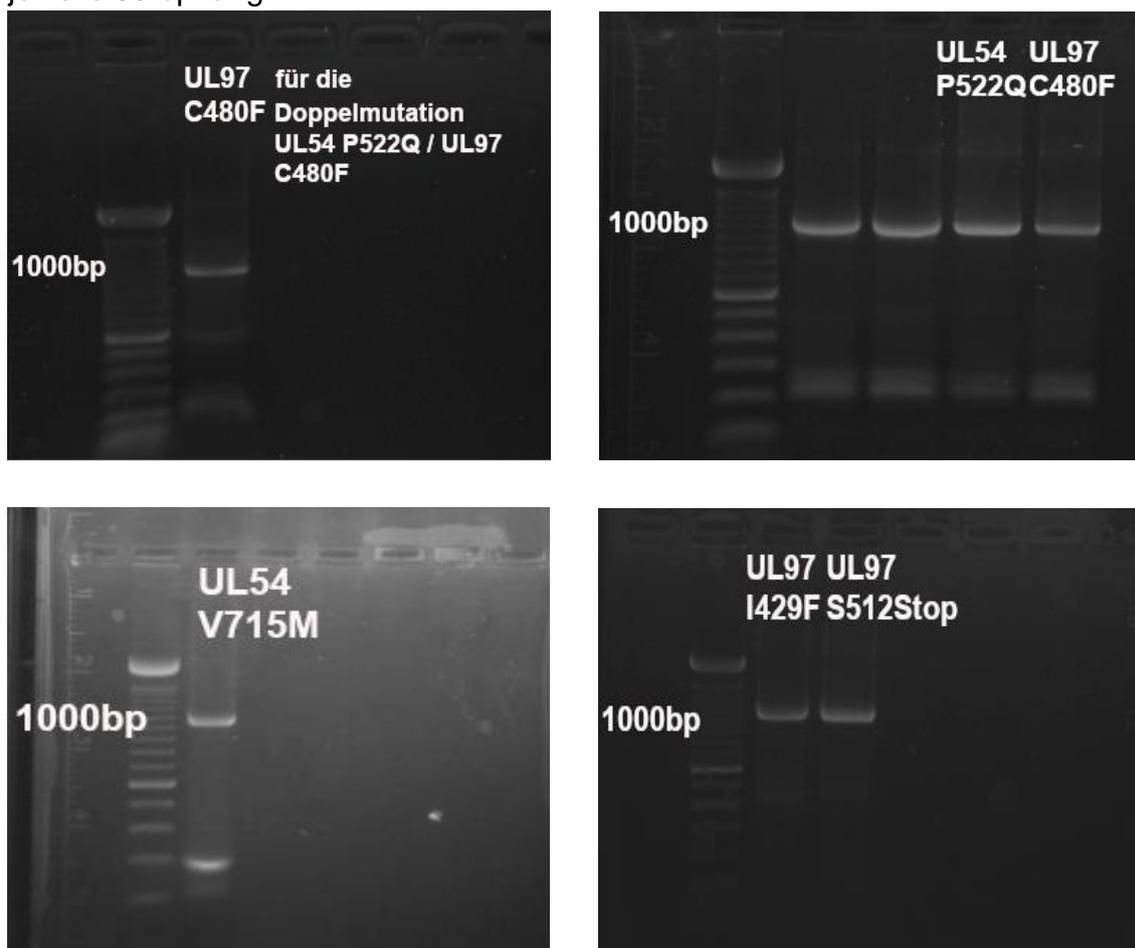


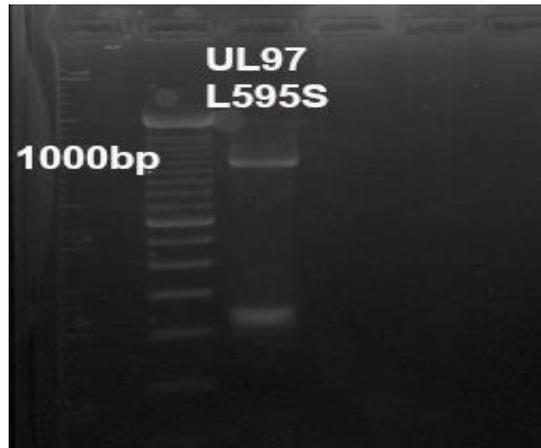
**Abbildung 14:** Pipettierschema am Beispiel eines Plaquereduktionsassays für Ganciclovir (GCV). Drei Verdünnungen infizierter HFF wurden mit nicht infizierten ARPE-19-Zellen vermischt und jeweils 100 µl Zellsuspension auf ein Well gegeben. Die Zellen wurden mit verschiedenen Verdünnungen Virostatikalösung (100 µl / Well) sieben Tage lang inkuliert. Die erste und die letzte Reihe dienten als Referenzreihen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Generierung von PCR-Produkten mit definierten Punktmutationen

Die Mutagenese-PCR für die UL97-Mutationen C480F, I429F, L595S und S512Stop und für die UL54-Mutationen P522Q und V715M wurde, wie im Abschnitt 2.2.2 beschrieben, durchgeführt. Die erfolgreiche PCR jeder Mutation konnte durch Gelelektrophorese, wie im Abschnitt 2.2.3 beschrieben, bestätigt werden und entsprechende Gelelektrophoresen sind in Abbildung 15 dargestellt. Alle PCR-Produkte hatten eine Länge von 1121 bp. Hierbei war der Anteil des Kanamycinresistenzgens 995 bp und die beiden homologen HCMV-Sequenzen jeweils 63 bp lang.





**Abbildung 15:** PCR für En-passant Mutagenese nach Tischer et al. (Tischer et al., 2006). Die PCR-Produkte wurden auf 1 % Agarosegel geladen und bei 100 Volt aufgetrennt.

### 3.2 BAC-Mutagenese und Sequenzierung der entsprechenden Region in UL54 und UL97

Die Generierung der rekombinanten BACs wurde in zwei unabhängigen Rekombinationsschritten in *E. coli* GS1783 / TB40-BACKL7-UL32EGFP durchgeführt. Eine erfolgreiche Elektroporation wurde bei allen sechs Mutationen erreicht, ebenso die erfolgreiche Entfernung des positiven Selektionsmarkers. Für die Doppelmutationen UL54 P522Q / UL97 C480F und UL54 V715M / UL97 L595S wurde die UL97-Mutation in die mutierte BAC-DNA von UL54 V715M oder UL54 P522Q elektroporiert. Anschließend wurde die BAC-DNA durch eine Minipräparation aus Kanamycin-sensitiven Bakterienkolonien isoliert und sequenziert. Für alle sechs Mutationen konnte die gewünschte Punktmutation nachgewiesen werden.

**C480F TGC → TTC aus UL97 C480F**  
 ATCGTGC<sup>G</sup>CGCCGCGCTGTTCGATTACAGCCT

**P522Q CCG → CAG aus UL54 P522Q**  
 CTGTCCTACAAGGACATCCAGCGTTGTTTCG

**C480F TGC → TTC aus UL54 P522Q / UL97 C480F**  
 TCGTGC<sup>G</sup>CGCCGCGCTGTTCGATTACAGCCTC

**P522Q CCG → CAG aus UL54 P522Q / UL97 C480F**  
 CCTGTCCTACAAGGACATCCAGCGTTGTTTCGT

**S512Stop TCG → TAG aus UL97 S512Stop**  
 CGCCGCATCCCCAACTGCTAGCACCGTCTGCG

**I429F ATC → TTC aus UL97 I429F**  
 AGTGGAAAGCTGGCGTGCATCGACAGCTACCG

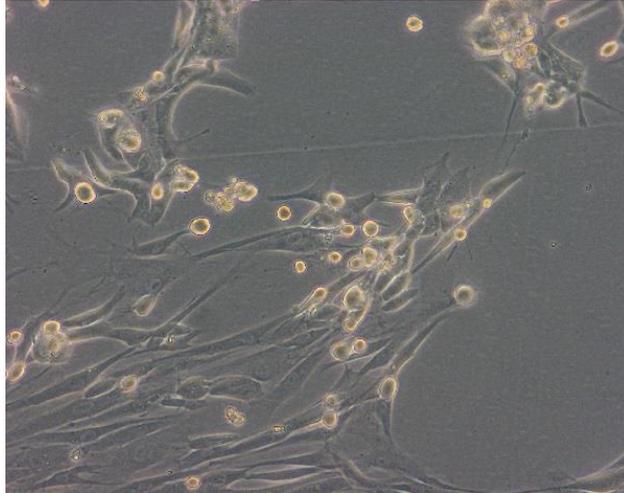
**L595S TTG → TCG aus UL54 V715M / UL97 L595S**  
 GCGGCCTGCCGCGCTGGAGAACGGTAAGC

**V715M GTG → ATG aus UL54 V715M / UL97 L595S**  
 TGGGTTACTACAACGACCCCGTGGCCATGTT

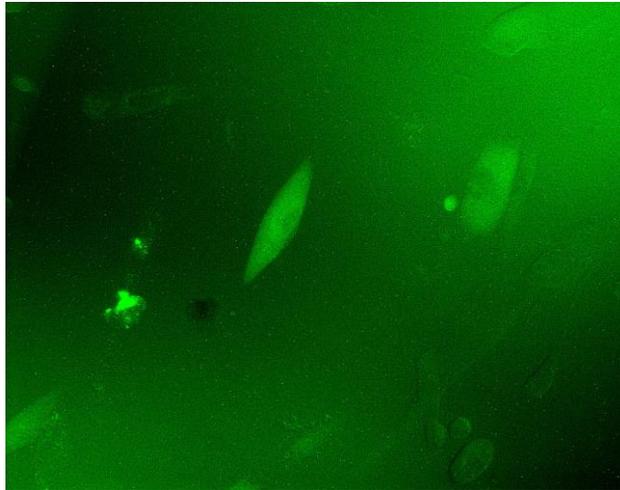
**Abbildung 16:** Sequenzanalyse der BAC-DNA. Vorhandene Punktmutation konnte für alle Mutationen (UL54 P522Q, UL97 Mutationen C480F, S512Stop, I429F und die Doppelmutationen UL54 P522Q / UL97 C480F und UL54 V715M / UL97 L595S nachgewiesen werden. Schwarz hinterlegt ist der Basenpaaraustausch. Die Wildtypsequenzen befinden sich in Appendix 1 und 2.

### 3.3 Transfektion der Bacmid-DNA in HFF

Durch eine Midipräparation wurde die Bacmid-DNA aus Bakterienkolonien isoliert, bei denen die erfolgreiche Mutagenese zuvor in der Sequenzierung bestätigt worden war. Diese wurde in HFF transfiziert, wie in Abschnitt 2.2.11 beschrieben. Nach erfolgreicher Transfektion konnte der zytopathische Effekt einer HCMV-Infektion nach ungefähr 2-3 Wochen beobachtet werden. Aufgrund des UL32EGFP Fusionproteins konnte das Wachstum von Viren auch unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden. Die Transfektion gelang bei den Mutationen UL54 P522Q, UL97 C480F, UL97I429F, UL54P522Q / UL97C480F und UL54V715M / UL97L595S. Auch bei dem unveränderten Stamm TB40-BACKL7-UL32EGFP, der als Referenzstamm für die phänotypischen Assays diente, gelang die Transfektion. Die UL97 Mutation S512Stop konnte in drei unabhängigen Versuchen nicht erfolgreich transfiziert werden.



**Abbildung 17:** zytopathischer Effekt der HCMV-Infektion auf HFF.



**Abbildung 18:** Expression des viralen, kapsid-assoziierten Tegmentumproteins UL32 resultiert in der Synthese des C-terminalen Fusionsproteins UL32EGFP und eine virale Infektion konnte dadurch unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar werden.

### 3.4 Sequenzierung des Virusüberstands, um das Vorhandensein der gewünschten Punktmutationen zu beweisen und das Auftreten von unerwünschten Basenpaarveränderungen zu widerlegen

Mit dem QIAamp DNA Blood Mini-Kit von Qiagen wurde virale DNA isoliert und erneut sequenziert, um das Vorhandensein der gewünschten Mutation zu beweisen, beziehungsweise unerwünschte Basenpaaränderungen auszuschließen. Abbildung 19 zeigt relevante Sequenzen mit den jeweiligen gewünschten Punktmutationen.

**C480F TGC → TTC aus UL97 C480F**  
 :CGCGCTGT**T**CGATTACAGCCTCAGCGAGCCC`

**P522Q CCG → CAG aus UL54 P522Q**  
 CTACAAGGACATCC**A**GCGTTGTTTCGTGGCT`

**C480F TGC → TTC aus UL54 P522Q / UL97 C480F**  
 TCGCGCGCCGCGCTGT**T**CGATTACAGCCTCAGCGAGCCCTAT`

**P522Q CCG → CAG aus UL54 P522Q / UL97 C480F**  
 TCCTACAAGGACATCC**A**GCGTTGTTTCGTGGC`

**I429F ATC → TTC aus UL97 I429F**  
 a g t g g A a g C T G G C G T G C **T T** C g a c a G C T A C c g`

**L595S TTG → TCG aus UL54 V715M / UL97 L595S**  
 CGCGGCCCTGCCGCGGT**G**GGAGAAcGGTAAG`

**V715M GTG → ATG aus UL54 V715M / UL97 L595S**  
 TACAACGACCCCGTGGCC**A**TGTTCGACTTTG`

**Abbildung 19:** Sequenzanalyse des Virusüberstandes. Vorhandene Punktmutation konnte für alle Mutationen (UL54 P522Q, UL97 Mutationen C480F, I429F und die Doppelmutationen UL54 P522Q / UL97 C480F und UL54 V715M / UL97 L595S nachgewiesen werden. Schwarz hinterlegt ist der Basenpaaraustausch. Die Wildtypsequenzen befinden sich in Appendix 1 und 2.

### 3.5 Phänotypische Charakterisierung der rekombinanten HCMV-Stämme über Wachstumsversuche

Der Einfluss der eingefügten Punktmutationen auf die Replikationskinetik wurde in Wachstums-Assays untersucht. Insgesamt wurden pro Mutation drei unabhängige Wachstumskurven erstellt. Für Ein-Schritt Replikationszyklen wurden HFF mit einer MOI von 1 infiziert und die Assays wie im Abschnitt 2.2.14 beschrieben durchgeführt. HCMV-TB40-BACKL7-UL32EGFP diente als

Referenz. An acht aufeinanderfolgenden Tagen wurde Virusüberstand eines Wells entnommen und bei -80 °C eingefroren. Anschließend wurde die TCID<sub>50</sub> jedes Virusüberstands bestimmt. Für jede Mutation wurden drei unabhängige Assays durchgeführt. Tabelle 5 zeigt die Durchschnittswerte von log<sub>10</sub>(TCID<sub>50</sub>) / ml der UL54-, UL97-, und UL97 / UL54-Mutationen. Die Ergebnisse wurden auch in Abbildung 20 dargestellt.

**Tabelle 5:** Wachstumsanalyse der UL54 Mutation P522Q, UL97 Mutationen C480F, I429F und der UL54 / UL97 Doppelmutationen UL54 P522Q / UL97 C480F und UL54 V715M / UL97 L595S. 6-Well-Platten mit HFF wurden mit einer MOI von 1 infiziert. An 8 aufeinanderfolgenden Tagen wurde der Überstand von jeweils einem Well entnommen und bei -80 °C eingefroren. Die TCID<sub>50</sub> jedes Überstandes wurde bestimmt und log<sub>10</sub>(TCID<sub>50</sub>) jedes Tages eingetragen. Pro Mutation wurden jeweils drei unabhängige Assays durchgeführt, der Mittelwert ist in der Tabelle eingetragen.

Virus	Tag	0	1	2	3	4	5	6	7	8
HCMV-TB40- BACKL7-UL32EGFP		3,93	1,27	1,13	1,0	1,4	2,0	3,77	5,27	6,6
HCMV-TB40- BACKL7- UL32EGFP / <b>P522Q</b>		4,97	1,63	2,1	1,67	2,43	4,0	5,87	7,1	7,5
HCMV-TB40- BACKL7- UL32EGFP / <b>C480F</b>		4,63	2,13	1,63	1,27	1,87	3,27	4,37	5,0	7,17
HCMV-TB40- BACKL7- UL32EGFP / <b>I429F</b>		3,7	1,53	1,13	1,0	1,13	2,1	3,27	4,2	4,77
HCMV-TB40- BACKL7- UL32EGFP / <b>P522Q / C480F</b>		3,67	1,4	1,53	1,4	3,03	4,03	6,43	7,43	7,27
HCMV-TB40- BACKL7- UL32EGFP / <b>V715M / L595S</b>		4,6	2,37	1,87	1,37	2,83	4,27	6,1	7,43	7,5

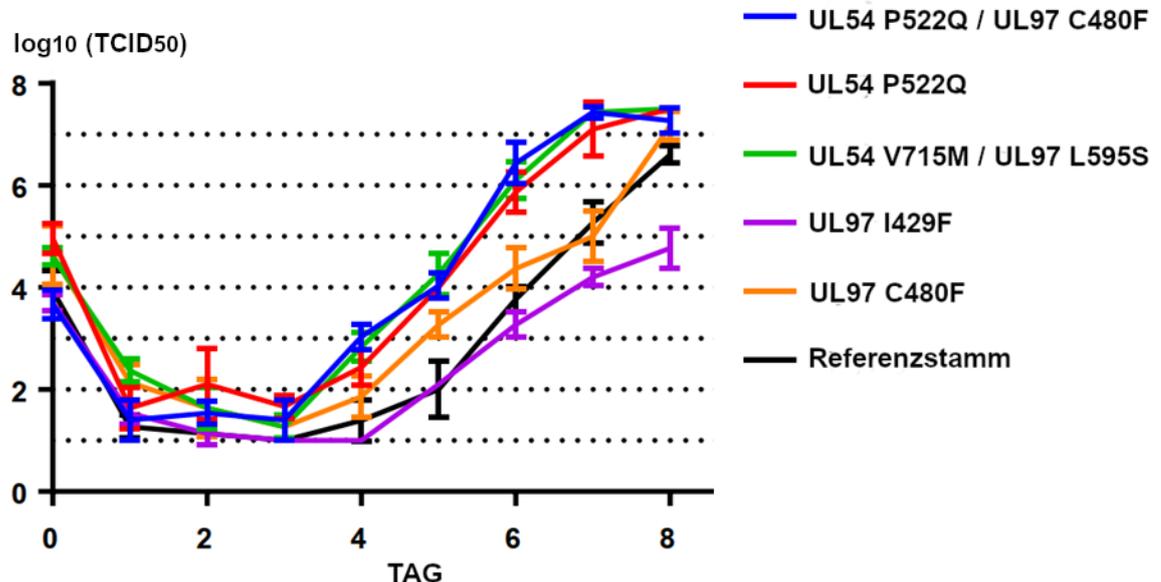
Wie in der Tabelle zu sehen, sank der Virustiter bei allen Mutationen wie auch beim Referenzstamm zunächst stark ab, um dann ab Tag 4 wieder anzusteigen. Der Referenzstamm HCMV-TB40-BACKL7-UL32EGFP startete mit einem Ausgangswert von log<sub>10</sub>(TCID<sub>50</sub>) von fast 4, der Virustiter sank dann auf knapp über log<sub>10</sub>(TCID<sub>50</sub>) = 1, verblieb auf einem niedrigen Level bis Tag 3, um dann ab

Tag 4 wieder anzusteigen. An Tag 6 wurde ein Virustiter von  $\log_{10}(\text{TCID}_{50}) = 6,6$  erreicht.

Die Doppelmutationen UL54 P522Q / UL97 C480F, UL54 V715M / UL97 L595S und die UL54-Mutation P522Q zeigten eine sehr ähnliche Wachstumskinetik. Dabei waren die Virustiter insgesamt etwas höher als die des Referenzstamms. Von Tag 0 auf Tag 1 sank der Virustiter auf weit unter die Hälfte des Ausgangswertes ab, verblieb bis Tag 3 auf einem niedrigen Level, um dann ab Tag 4 wieder anzusteigen. Ab Tag 7 wurde ein Plateau von einem  $\log_{10}(\text{TCID}_{50})$  über 7 erreicht.

Die UL97-Mutation C480F war in ihrer Wachstumskinetik dem Referenzstamm sehr ähnlich. Die Virustiter waren insgesamt etwas höher als die des Referenzstammes, an Tag 7 etwas niedriger und an Tag 8 war der Virustiter mit  $\log_{10}(\text{TCID}_{50})$  über 7 wieder etwas höher.

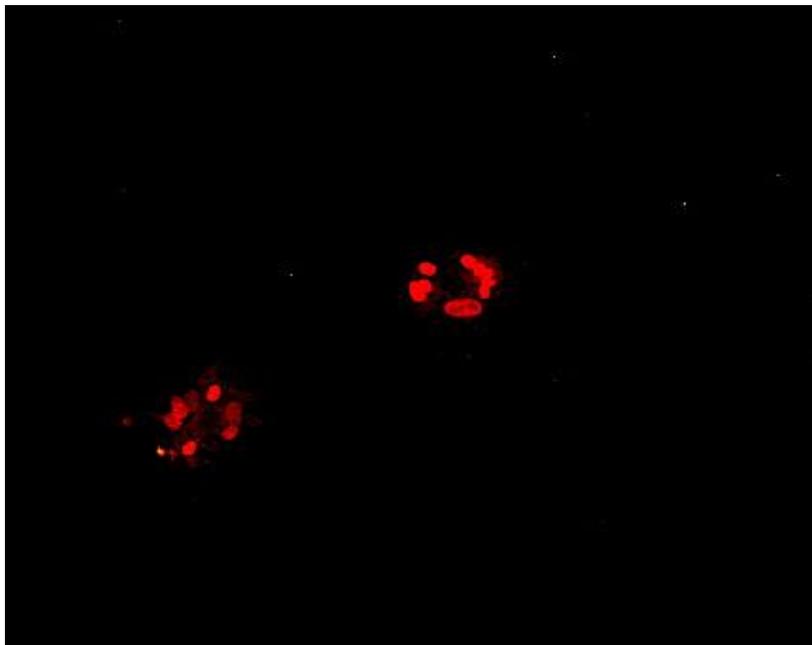
Die UL97-Mutation I429F zeigte in ihrer Wachstumskinetik bis Tag 5 einen sehr ähnlichen Verlauf wie der Referenzstamm. Danach blieb der Virustiter stets niedriger, bis er an Tag 8 ca. 2 log-Stufen niedriger war.



**Abbildung 20:** Ein-Schritt-Wachstumszyklen der UL54-Mutation P522Q, der UL97-Mutationen C480F und I429F und der UL54 / UL97-Doppelmutationen UL54 P522Q / UL97 C480F und UL54 V715M / UL97 L595S.

### 3.6 Phänotypische Charakterisierung der rekombinanten HCMV-Stämme durch Plaque-Reduktions-Assays

Um herauszufinden, welche Mutationen Resistenzen gegen Ganciclovir, Cidofovir oder Foscarnet auslösten, wurden Plaque-Reduktions-Assays (PRA) durchgeführt. Hierfür wurde eine Kokultur mit infizierten HFF und nicht infizierten ARPE-19 Zellen mit verschiedenen Verdünnungsstufen der Virostatika sieben Tage lang inkubiert und Plaqueformation unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt.



**Abbildung 21:** Plaques in der HFF/ARPE-19 Co-Kultur. Infizierte HFF wurden mit nicht-infizierten ARPE-19 vermischt und sieben Tage lang inkubiert. Eine Plaque ist definiert als mindestens fünf nah beieinander liegende infizierte Zellen.

Pro Wirkstoff und Mutation wurden mindestens drei unabhängige Assays durchgeführt. Unterschieden sich die  $EC_{50}$  der drei Assays zu stark, wurden weitere zwei bis drei Assays durchgeführt, um die Wahrscheinlichkeit falscher Ergebnisse durch Ausreißer zu verringern. Die effektive Dosis 50 ( $EC_{50}$ ) ist definiert als diejenige Konzentration von Virostatikum, bei der das Viruswachstum um 50 % reduziert werden konnte. Die Evaluation erfolgte mit dem Programm SPSS über die Probit Analyse. Die  $EC_{50}$  jedes rekombinanten HCMV Stammes wurde mit der  $EC_{50}$  des Referenzstammes HCMV-TB40-

BACKL7-UL32EGFP verglichen. Resistenz ist definiert als ein Verhältnis von  $\geq 2$  (Lurain and Chou, 2010). Die  $EC_{50}$ -Werte des Referenzstamms betragen  $0,902 \mu\text{M}$  für Cidofovir,  $1,766 \mu\text{M}$  für Ganciclovir und  $74,969 \mu\text{M}$  für Foscarnet. Mit diesen Werten wurden die  $EC_{50}$ -Werte der einzelnen Mutationen verglichen. Die UL54-Mutation P522Q und die UL97-Mutation C480F waren als Einzelmutation jeweils sensibel gegenüber Cidofovir, Ganciclovir und Foscarnet. Die Doppelmutation UL54 P522Q / UL97 C480F zeigte jedoch  $EC_{50}$  Werte, die bei Ganciclovir ein Verhältnis von 5,34 und bei Foscarnet ein Verhältnis von 2,46 aufwiesen. Nach Lurain und Chou weist die Doppelmutation UL54 P522Q / UL97 C480F also eine Ganciclovir- und Foscarnetresistenz auf.

Die UL97-Mutation I429F war sensitiv gegenüber Cidofovir und Foscarnet. Das Verhältnis der  $EC_{50}$  bei Ganciclovir gegenüber der des Referenzstamms betrug allerdings 5,44, es lag also eine Ganciclovirresistenz vor.

Die Doppelmutation UL54 V715M / UL97 L595S zeigte in dieser Arbeit eine Ganciclovirresistenz mit einem Verhältnis von 4,67 und eine Foscarnetresistenz mit einem Verhältnis von 3,254. Gegenüber von Cidofovir war die Doppelmutation jedoch sensibel.

**Tabelle 6: Plaquereduktionsassay des Referenzstamms HCMV-TB40-BACKL7-UL32EGFP.** Gegeben ist die mittlere effektive Dosis ( $EC_{50}$ ) in  $\mu\text{M}$  von den Wirkstoffen Cidofovir, Ganciclovir und Foscarnet. Gegeben sind außerdem die obere und die untere Grenze des 95 %-Konfidenzintervalls und der Mittelwert der Assays.

Cidofovir	$EC_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]	Untere Grenze (95%)	Obere Grenze (95%)	Mittelwert	Verhältnis
Assay 1	1,056	0,638	1,819	0,902	-
Assay 2	1,001	0,425	2,636		
Assay 3	0,649	0,280	1,430		
Ganciclovir	$EC_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]	Untere Grenze (95%)	Obere Grenze (95%)	Mittelwert	Verhältnis
Assay 1	1,656	1,088	2,300	1,766	-
Assay 2	2,032	0,648	3,947		
Assay 3	1,610	1,074	2,213		
Foscarnet	$EC_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]	Untere Grenze (95%)	Obere Grenze (95%)	Mittelwert	Verhältnis
Assay 1	61,065	42,669	78,422	74,969	-
Assay 2	97,381	78,445	115,658		
Assay 3	66,461	48,239	83,654		

**Tabelle 7: Plaquereduktionsassay der UL54-Mutation P522Q.** Gegeben ist die mittlere effektive Dosis ( $EC_{50}$ ) in  $\mu\text{M}$  von den Wirkstoffen Cidofovir, Ganciclovir und Foscarnet. Gegeben sind außerdem die obere und die untere Grenze des 95 %-Konfidenzintervalls, der Mittelwert der Assays und das Verhältnis zu dem jeweiligen Mittelwert des Referenzstamms.

Cidofovir	$EC_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]	Untere Grenze (95%)	Obere Grenze (95%)	Mittelwert	Verhältnis
Assay 1	0,525	0,119	1,591	0,463	0,512
Assay 2	0,365	0,198	0,596		
Assay 3	0,499	0,362	0,670		
Ganciclovir	$EC_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]	Untere Grenze (95%)	Obere Grenze (95%)	Mittelwert	Verhältnis
Assay 1	2,776	1,388	4,571	2,78	1,57
Assay 2	3,357	2,471	4,386		
Assay 3	2,197	1,495	2,999		
Foscarnet	$EC_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]	Untere Grenze (95%)	Obere Grenze (95%)	Mittelwert	Verhältnis
Assay 1	103,562	81,522	124,888	78,954	1,053
Assay 2	49,503	28,969	69,110		
Assay 3	64,421	45,880	81,899		
Assay 4	76,348	56,992	94,567		
Assay 5	89,426	68,461	109,414		
Assay 6	90,465	73,045	107,350		

**Tabelle 8: Plaquereduktionsassay der UL97-Mutation C480F.** Gegeben ist die mittlere effektive Dosis ( $EC_{50}$ ) in  $\mu\text{M}$  von den Wirkstoffen Cidofovir, Ganciclovir und Foscarnet. Gegeben sind außerdem die obere und die untere Grenze des 95 %-Konfidenzintervalls, der Mittelwert der Assays und das Verhältnis zu dem jeweiligen Mittelwert des Referenzstamms.

Cidofovir	$EC_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]	Untere Grenze (95%)	Obere Grenze (95%)	Mittelwert	Verhältnis
Assay 1	0,738	0,542	0,998	1,37	1,52
Assay 2	1,241	0,665	2,539		
Assay 3	0,763	0,573	1,012		
Assay 4	2,436	1,614	4,105		
Assay 5	1,656	0,912	3,490		
Ganciclovir	$EC_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]	Untere Grenze (95%)	Obere Grenze (95%)	Mittelwert	Verhältnis
Assay 1	3,895	1,650	7,291	3,4	1,93
Assay 2	2,522	1,073	4,062		
Assay 3	3,794	1,946	6,351		
Foscarnet	$EC_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]	Untere Grenze (95%)	Obere Grenze (95%)	Mittelwert	Verhältnis
Assay 1	140,018	66,637	219,274	115,5	1,54
Assay 2	96,967	76,373	116,860		
Assay 3	105,641	60,967	147,835		
Assay 4	125,692	94,220	156,922		
Assay 5	109,186	79,538	137,624		

**Tabelle 9: Plaquereduktionsassay der UL97-Mutation I429F.** Gegeben ist die mittlere effektive Dosis (EC<sub>50</sub>) in µM von den Wirkstoffen Cidofovir, Ganciclovir und Foscarnet. Gegeben sind außerdem die obere und die untere Grenze des 95 %-Konfidenzintervalls, der Mittelwert der Assays und das Verhältnis zu dem jeweiligen Mittelwert des Referenzstamms. Resistenz ist definiert als ein Verhältnis  $\geq 2$  und entsprechende Verhältnisse fett gedruckt.

Cidofovir	EC <sub>50</sub> [µM]	Untere Grenze (95%)	Obere Grenze (95 %)	Mittelwert	Verhältnis
Assay 1	0,743	0,320	1,648	0,524	0,58
Assay 2	0,339	0,141	0,626		
Assay 3	0,489	0,369	0,635		
Ganciclovir	EC <sub>50</sub> [µM]	Untere Grenze (95 %)	Obere Grenze (95 %)	Mittelwert	Verhältnis
Assay 1	7,282	5,670	9,353	9,613	<b>5,44</b>
Assay 2	9,628	7,877	11,820		
Assay 3	11,930	9,448	15,366		
Foscarnet	EC <sub>50</sub> [µM]	Untere Grenze (95 %)	Obere Grenze (95 %)	Mittelwert	Verhältnis
Assay 1	83,662	66,018	100,518	73,7	0,98
Assay 2	77,438	61,849	92,348		
Assay 3	59,990	43,244	75,698		

**Tabelle 10: Plaquereduktionsassay der UL54 / UL97-Doppelmutation UL54 V715M / UL97 L595S.** Gegeben ist die mittlere effektive Dosis (EC<sub>50</sub>) in µM von den Wirkstoffen Cidofovir, Ganciclovir und Foscarnet. Gegeben sind außerdem die obere und die untere Grenze des 95 %-Konfidenzintervalls, der Mittelwert der Assays und das Verhältnis zu dem jeweiligen Mittelwert des Referenzstamms. Resistenz ist definiert als ein Verhältnis  $\geq 2$  und entsprechende Verhältnisse fett gedruckt.

Cidofovir	EC <sub>50</sub> [µM]	Untere Grenze (95%)	Obere Grenze (95%)	Mittelwert	Verhältnis
Assay 1	0,334	0,232	0,457	0,445	0,493
Assay 2	0,541	0,312	0,902		
Assay 3	0,460	0,347	0,599		
Ganciclovir	EC <sub>50</sub> [µM]	Untere Grenze (95%)	Obere Grenze (95%)	Mittelwert	Verhältnis
Assay 1	8,467	3,406	25,318	8,255	<b>4,67</b>
Assay 2	8,097	2,735	30,008		
Assay 3	8,201	2,371	39,722		
Foscarnet	EC <sub>50</sub> [µM]	Untere Grenze (95%)	Obere Grenze (95%)	Mittelwert	Verhältnis
Assay 1	208,558	171,537	253,886	243,928	<b>3,254</b>
Assay 2	256,731	201,341	342,786		
Assay 3	266,495	216,829	339,251		

**Tabelle 11: Plaquereduktionsassay der UL54 / UL97-Doppelmutation UL54 P522Q / UL97 C480F.** Gegeben ist die mittlere effektive Dosis ( $EC_{50}$ ) in  $\mu\text{M}$  von den Wirkstoffen Cidofovir, Ganciclovir und Foscarnet. Gegeben sind außerdem die obere und die untere Grenze des 95 %-Konfidenzintervalls, der Mittelwert der Assays und das Verhältnis zu dem jeweiligen Mittelwert des Referenzstamms. Resistenz ist definiert als ein Verhältnis  $\geq 2$  und entsprechende Verhältnisse fett gedruckt.

Cidofovir	$EC_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]	Untere Grenze (95%)	Obere Grenze (95%)	Mittelwert	Verhältnis
Assay 1	1,289	0,826	2,129	1,42	1,57
Assay 2	1,039	0,451	2,667		
Assay 3	1,928	1,372	2,858		
Ganciclovir	$EC_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]	Untere Grenze (95%)	Obere Grenze (95%)	Mittelwert	Verhältnis
Assay 1	8,266	2,912	27,740	9,4272	<b>5,34</b>
Assay 2	1,904	0,807	3,306		
Assay 3	8,540	6,011	12,379		
Assay 4	12,971	9,654	18,232		
Assay 5	15,455	10,028	27,268		
Foscarnet	$EC_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]	Untere Grenze (95%)	Obere Grenze (95%)	Mittelwert	Verhältnis
Assay 1	183,060	160,090	207,753	184,766	<b>2,46</b>
Assay 2	119,854	97,347	142,124		
Assay 3	147,535	127,845	167,748		
Assay 4	223,374	190,803	262,203		
Assay 5	250,206	208,683	305,106		

## 4 Diskussion

### 4.1 Generierung von rekombinantem HCMV mit definierten Punktmutationen über die en-passant Mutagenese

Das humane Cytomegalovirus (HCMV) kann bei immunsupprimierten Patienten wie zum Beispiel bei Patienten nach Stammzelltransplantation oder Transplantation solider Organe, sowie bei kongenitaler Übertragung lebensbedrohliche Infektionen verursachen. Durch eine frühe antivirale Therapie kann die Wahrscheinlichkeit einer klinisch manifesten Erkrankung reduziert werden, jedoch steigt mit der Therapiedauer auch die Wahrscheinlichkeit einer Virostatikaresistenzentwicklung. Die molekulare Ursache der Resistenzen gegen die am häufigsten eingesetzten Virostatika Ganciclovir, Cidofovir und Foscarnet sind Mutationen in der UL97-Serin-Threonin-Phosphotransferase und in dem viralen Polymerasegen UL54.

In dieser Arbeit wurden mittels „en-passant“ BAC-Technologie die neu entdeckten Mutationen UL97 S512Stop, UL97 C480F, UL97 I429F und UL54 P522Q, Kombinationen aus Mutationen in beiden Genen, nämlich UL54 P522Q / UL97 C480F, sowie die Kombination aus zwei schon einzeln zuvor charakterisierten Mutationen UL54 V715 / UL97 L595S generiert und anschließend funktionell charakterisiert. Hierfür wurden zunächst PCR-Produkte hergestellt, die die gewünschte Punktmutation sowie ein Kanamycinresistenzgen zur späteren positiven Selektion enthielten. Das Kanamycinresistenzgen war von einer Erkennungssequenz für I-SceI, einer arabinoseinduzierten Endonuklease, flankiert, durch die später die restlose Entfernung des Kanamycinresistenzgens erreicht werden konnte. Die Mutagenese des HCMV Stamms erfolgte im *E. coli* Stamm *GS1783/TB40-BACKL7*. Dieser enthielt das Genom des endotheliotropen HCMV Laborstrangs TB40 / E als BAC, I-SceI und einen defektiven  $\lambda$  Prophagen, der für ein Red-Rekombinasesystem kodierte. Das Red-Rekombinasesystem wurde nach Elektroporation des jeweiligen PCR-Produkts temperaturabhängig induziert und die gewünschte Mutation konnte so in das BAC-Genom integriert werden. Durch die Kanamycinresistenz konnten

anschließend Bakterien selektiert werden, die das PCR-Produkt erfolgreich aufgenommen hatten. Anschließend wurde durch die Aktivierung von I-SceI das Kanamycinresistenzgen aus der DNA geschnitten. Die einzige Veränderung der Bacmid-DNA war jetzt also die gewünschte Punktmutation. Es wurden diejenigen Kulturen selektiert, bei denen das Kanamycinresistenzgen erfolgreich entfernt wurde. Da schon in vorherigen Arbeiten gezeigt wurde, dass trotz vorheriger erfolgreicher Integration des PCR-Produktes mit dem Kanamycinresistenzgen eine Wildtypsequenz vorliegen konnte (Fischer, 2015), wurden die Bakterienkolonien, bei denen der positive Selektionsmarker erfolgreich entfernt wurde, vor der Transfektion auf die Zellkulturen alle sequenziert. Ein Grund für das Verbleiben der Wildtypsequenz könnte der hohe GC-Gehalt in den Regionen, die dem Kanamycinresistenzgen direkt anliegen, sowie der hohe GC-Gehalt der äußeren Enden des PCR-Produktes, sein. Ist der GC-Gehalt in den inneren Bereichen höher, ist dadurch die Bindungsenthalpie hier höher und die inneren Bereiche werden bei der homologen Rekombination bevorzugt. Hierdurch kann es geschehen, dass der positive Selektionsmarker und die I-SceI-Erkennungssequenz integriert werden, die gewünschte Punktmutation allerdings nicht (Fischer, 2015). Nach Bestätigung der erfolgreichen Integration der gewünschten Mutationen wurde die Bacmid-DNA anschließend isoliert und auf HFF transfiziert. Eine Plaqueformation mit HCMV-infizierten Zellen wurde bei allen Mutationen nach 2-3 Wochen beobachtet, außer bei der UL97-Mutation S512Stop. Hier konnten auch nach drei Versuchen mit jeweils neu hergestellten PCR-Produkten keine zytopathischen Effekte oder grüne Fluoreszenz gesehen werden. Es wurde zuvor gezeigt, dass die Proteinkinase UL97 eine wichtige Rolle in der Virusreplikation spielt (Prichard et al., 1999, Marschall et al., 2002, Krosky et al., 2003). Ohne UL97 ist die virale DNA-Synthese ineffizient, virale Strukturproteine aggregieren im Nukleus und reife Kapside können den Nukleus nicht verlassen (Prichard, 2009). Weiterhin konnte die Mutation UL97 S512Stop nur ein einziges Mal bei einem neunjährigen Patienten isoliert werden und auch nur in 10 % der Proben. In folgenden Proben konnte die Mutation nicht mehr nachgewiesen werden (Houldcroft et al., 2016). All diese Gründe machen es wahrscheinlich, dass die Mutation UL97 S512Stop die Replikation von HCMV so

stark einschränkt, dass ein weiteres Wachstum verhindert wird und die Mutation schnell wieder herausselektioniert wurde.

#### **4.2 Phänotypische Charakterisierung von rekombinanten HCMV-Mutationen mit definierten Punktmutationen durch Wachstums-Assays**

Das Wachstumsverhalten von HCMV-Stämmen kann eine große Relevanz auf die Behandlung haben. So benötigen Stämme mit einer sehr schnellen Wachstumskinetik oft deutlich höhere Dosen an Virostatika. Auf der anderen Seite können Mutationen, die zwar eine gewisse Resistenz gegen ein bestimmtes Medikament aufweisen, andererseits aber die Replikation von HCMV stark behindern, trotzdem durch dieses Medikament behandelbar sein (Smith et al., 1997). pUL54 ist als virale DNA-Polymerase essenziell für die virale DNA-Replikation und auch pUL97 wird für eine effiziente Virusreplikation benötigt (Hamilton et al., 2014).

In dieser Arbeit wurde aus diesem Grund das Wachstumsverhalten aller Mutationen über die Analyse eines Ein-Schritt-Wachstumszyklus beobachtet und mit dem Referenzstamm HCMV-TB40-BACKL7-UL32EGFP verglichen. Hierfür wurden Zellen mit einer MOI von 1 infiziert und anschließend der Virusüberstand an acht aufeinanderfolgenden Tagen eingefroren und daraus die TCID<sub>50</sub> bestimmt. Für jede Mutation wurden die Assays drei Mal wiederholt.

Bei allen Mutationen und auch dem Referenzstamm sank der Virustiter zunächst stark ab, um dann ab Tag 4 wieder anzusteigen.

Die Doppelmutationen UL54 P522Q / UL97 C480F, UL54 V715M / UL97 L595S und die UL54-Mutation P522Q zeigten eine sehr ähnliche Wachstumskinetik. Dabei waren die Virustiter insgesamt etwas höher als die des Referenzstamms, glichen sich aber zum Ende hin immer weiter an. Dass die Mutationen tatsächlich alle einen Wachstumsvorteil bringen, ist jedoch unwahrscheinlich. Vielmehr wurde schon in vorherigen Arbeiten, wie zum Beispiel bei Fischer, 2015, eine natürliche Variabilität von Ein-Schritt-Wachstumszyklen gezeigt (Fischer, 2015). In dieser Arbeit wurde zudem HCMV-TB40-BACKL7-UL32EGFP neu in HFF transfiziert und nicht der bereits in HFF transfizierte Stamm verwendet, der in den Vorgängerarbeiten genutzt wurde. Dies könnte das veränderte

Wachstumsverhalten des Referenzstamms in dieser Arbeit im Vergleich zu beispielsweise der des Referenzstamms bei Fischer, 2015 erklären (Fischer, 2015). Hier stieg der Virustiter ab Tag 3 kontinuierlich an, um dann ab Tag 6 ein Plateau zu erreichen, zeigte also ein sehr ähnliche Wachstumskinetik wie UL54 P522Q / UL97 C480F, UL54 V715M / UL97 L595S und die UL54-Mutation P522Q. Es ist nicht auszuschließen, dass es in dieser Arbeit zu Veränderungen im Gesamtgenom gekommen sein könnte, die nicht detektierbar waren. Um solche Veränderungen des Gesamtgenoms aufzuspüren, wäre eine Sequenzierung des gesamten Genoms (whole genome sequencing) von Nöten gewesen, da nicht nur Mutationen in pUL54 und pUL97 zu einem Wachstumsdefizit führen können (Hamilton et al., 2014).

Die UL97-Mutation C480F war in ihrer Wachstumskinetik dem Referenzstamm sehr ähnlich.

Die UL97-Mutation I429F zeigte in ihrer Wachstumskinetik bis Tag 5 einen sehr ähnlichen Verlauf wie der Referenzstamm. Danach blieb der Virustiter stets niedriger, bis er an Tag 8 circa 2 log-Stufen niedriger war. Ein Aminosäureaustausch von dem verzweigt-kettigen Isoleucin zu dem aromatischen Phenylalanin könnte eine Änderung der Proteinkonformität verursachen. Da Codon 429 innerhalb der konservierten Region VI liegt (Gilbert and Boivin, 2005b) wäre es möglich, dass Mutationen an dieser Stelle zu Wachstumseinschränkungen führen könnten. Dies passt auch zu der Beobachtung, dass der Großteil der Mutationen in isolierten ganciclovirresistenten Isolaten zwischen Codon 590 bis 607 liegt. Die Häufung scheint dadurch zustande zu kommen, dass dieser Bereich für das Wachstum unerheblich scheint. Mutationen wie UL97 I429F sind deutlich seltener und haben oft einen größeren Einfluss auf das Wachstum (Lurain and Chou, 2010). Eine Übertragung der Ergebnisse auf die Klinik ist allerdings nur eingeschränkt möglich, da das in dieser Arbeit beobachtete Wachstumsverhalten in vitro und mit HFF als Zielzellen beobachtet wurde. In vivo mit unterschiedlichen Zielzellen könnte das Wachstumsverhalten anders sein.

### **4.3 Phänotypische Charakterisierung von rekombinanten HCMV-Mutationen durch Plaque-Reduktions-Assays**

Während eine HCMV-Infektion bei Gesunden meistens benigne abläuft, kann HCMV bei immunsupprimierten Patienten schwere Infektionen verursachen (El Helou and Razonable, 2019). Die am häufigsten gegen HCMV eingesetzten Virostatika sind Ganciclovir, Cidofovir und Foscarnet. Jedoch steigt bei länger andauernder Therapiedauer auch die Wahrscheinlichkeit einer Resistenzentwicklung (El Chaer et al., 2016, Lurain and Chou, 2010, Gilbert and Boivin, 2005b). Vor allem unter dem Selektionsdruck einer langen antiviralen Behandlung können auch mehrere Mutationen akkumulieren und zu einer verstärkten Resistenz gegen ein Virostatikum oder auch zu Resistenzen gegen mehrere Virostatika führen (Lurain and Chou, 2010).

Mutationen in UL97 führen zu Resistenzen gegen Ganciclovir, nicht aber gegen die anderen Virostatika, da nur Ganciclovir von pUL97 aktiviert werden muss. Mutationen in UL54 können abhängig von der Region, in der die Mutationen auftreten, zu Resistenzen gegen Ganciclovir, Cidofovir, Foscarnet oder auch gegen alle drei Virostatika gleichzeitig führen.

Ob die einzelnen Mutationen und Doppelmutationen, die in dieser Arbeit charakterisiert werden sollten, resistenzauslösend sind, wurde über Plaquereduktionsassays bestimmt. Dabei wurde eine Resistenz nach der Methode von Lurain und Chou ab einem Verhältnis von  $\geq 2$  im Vergleich mit dem Referenzstamm definiert (Lurain and Chou, 2010). Da die Plaques, die sich in den Plaque-Reduktions-Assays gebildet hatten, per Hand ausgezählt wurden, wurde nur die Verdünnung, bei der sich in der Referenzreihe 60-80 Plaques gebildet hatten, verwendet. So wurde die Wahrscheinlichkeit verringert, sich zu verzählen. Um die Wahrscheinlichkeit falscher Ergebnisse durch Ausreißer zu verringern, wurden pro Wirkstoff und Mutation außerdem mindestens drei unabhängige Assays durchgeführt. Unterschieden sich die  $EC_{50}$  der drei Assays zu stark, wurden weitere zwei bis drei Assays durchgeführt.

Die UL54-Mutation P522Q und die UL97-Mutation C480F waren als Einzelmutation jeweils sensibel gegenüber Cidofovir, Ganciclovir und Foscarnet. Mit einem Verhältnis von 1,93 war UL97 C480F jedoch schon dicht an der Grenze eines Verhältnisses von 2. Die Doppelmutation UL54 P522Q / UL97 C480F zeigte  $EC_{50}$  Werte, die bei Ganciclovir ein Verhältnis von 5,34 und bei Foscarnet ein Verhältnis von 2,46 aufwiesen. Nach Lurain und Chou weist die Doppelmutation UL54 P522Q / UL97 C480F also eine Ganciclovir- und Foscarnetresistenz auf. Dies unterstützt die Annahme, dass sich Doppelmutationen gegenseitig verstärken können, sodass die jeweils ganciclovirsensiblen Mutationen UL54 P522Q und UL97 C480F in der Kombination zu einer Ganciclovirresistenz führen. Gegenüber Cidofovir waren sowohl die Einzelmutationen als auch die Doppelmutation sensibel. UL54 P522Q liegt in der Region delta-C/ExoIII. Bekannte Mutationen in diesem Bereich führen für gewöhnlich zu einer Resistenz gegen Ganciclovir und Cidofovir und selten auch zu einer Resistenz gegen Foscarnet (Lurain and Chou, 2010). Unerwartet ist jedoch die Foscarnetresistenz der Doppelmutation, da die Einzelmutation UL54 P522Q foscarnetsensibel war. Mit einem Verhältnis von 2,46 war die Resistenz allerdings nicht besonders stark ausgeprägt. In den Plaquereduktionsassays zeigten sich drei von fünf Assays über einem Verhältnis von 2, zudem variierten die Mittelwerte der fünf Assays recht stark, weswegen statt drei fünf durchgeführt wurden. Eine Möglichkeit, um zu zeigen, ob möglicherweise auch eine unbeabsichtigte Mutation an anderer Stelle für die Foscarnetresistenz verantwortlich sein könnte, wäre eine Revertante ohne UL54 P522Q und UL97 C480F zu erzeugen und dann erneute Plaquereduktionsassays durchzuführen. Da die Plaque-Reduktions-Assays zudem schlecht standardisierbar sind, wäre eine weitere Möglichkeit der Verifizierung gewesen, einen schon bekannten resistenten Stamm zum Vergleich mitlaufen zu lassen.

Die UL97-Mutation I429F war wie zu erwarten sensitiv gegenüber Cidofovir und Foscarnet. Das Verhältnis der  $EC_{50}$  bei Ganciclovir gegenüber der des Referenzstamms betrug allerdings 5,44, also eine Ganciclovirresistenz. Dies zeigt erneut, dass zwar die meisten Mutationen in UL97, die eine Ganciclovirresistenz verursachen, bei Codon 460, 520 oder zwischen Codons

590 und 607 liegen (Chou et al., 2002), jedoch auch außerhalb dieser Bereiche resistenzverursachende Mutationen liegen können.

UL54 V715M wurde als Einzelmutation bereits 1998 von Cihlar et al. beschrieben und verursacht eine Foscarnetresistenz (Cihlar et al., 1998), passend dazu, dass Codon 715 in der Region II von pUL54 liegt, eine Region, in der Mutationen gewöhnlich nur eine Foscarnetresistenz auslösen (Lurain and Chou, 2010). Ein Aminosäureaustausch von Valin zu Methionin verursacht eine deutliche Vergrößerung der Seitenkette an dieser Stelle. Dies könnte die Konformität von pUL54 beeinflussen. UL97 L595S wurde 1995 von Wolf et al. als eine ganciclovirresistenzauslösende Mutation beschrieben (Wolf et al., 1995). Hier kann ein Aminosäureaustausch des verzweigt-kettigen Leucins zu Serin mit einer Hydroxylgruppe zu einer Konformationsänderung führen. In Kombination zeigte sich in dieser Arbeit ebenfalls eine Ganciclovirresistenz mit einem Verhältnis von 4,67 und eine Foscarnetresistenz mit einem Verhältnis von 3,254. Gegenüber von Cidofovir war die Doppelmutation jedoch wie zu erwarten sensibel. Ein additiver Effekt der Einzelmutationen, wie er zum Beispiel bei Fischer, 2015, beobachtet werden konnte, ließ sich hier jedoch nicht beobachten (Fischer, 2015).

## 5 Zusammenfassung

Das humane Cytomegalovirus (HCMV) kann bei immunsupprimierten Patienten zu lebensbedrohlichen Organmanifestationen führen und ist weltweit die wichtigste kongenitale Virusinfektion. Die am häufigsten gegen HCMV eingesetzten Medikamente sind Ganciclovir, Cidofovir und Foscarnet. Durch eine frühe antivirale Therapie kann die Wahrscheinlichkeit einer klinisch manifesten Erkrankung reduziert werden, jedoch steigt mit der Therapiedauer auch die Wahrscheinlichkeit einer Virostatikaresistenzentwicklung. Die molekulare Ursache der Resistenzen gegen Ganciclovir sind Mutationen in der UL97- Serin-Threonin- Phosphotransferase, Mutationen in dem viralen Polymerasegen UL54 können zu Resistenzen gegen Ganciclovir, Cidofovir und Foscarnet führen. Heutzutage ist die Resistenztestung der Wahl die genotypische Empfindlichkeitstestung, da diese innerhalb von Stunden durchgeführt werden kann. Diese Methode erfordert allerdings, dass die Mutationen zuvor durch eine phänotypische Resistenztestung charakterisiert wurden, da nur so zwischen resistenzauslösenden Mutationen und einfachen Polymorphismen unterschieden werden kann.

In dieser Arbeit wurden mittels der „en-passant“ BAC-Technologie (Tischer et al., 2006) die von Houldcroft et al. neu entdeckten Mutationen UL97 S512Stop, UL97 C480F, UL97 I429F und UL54 P522Q, Kombinationen aus Mutationen in beiden Genen, nämlich UL54 P522Q / UL97 C480F, sowie die von Sedlak et al. neu gefundene Kombination aus zwei schon zuvor einzeln charakterisierten Mutationen UL54 V715 / UL97 L595S generiert und anschließend funktionell charakterisiert (Houldcroft et al., 2016, Hall Sedlak et al., 2013).

Eine Transfektion der verschiedenen Mutationen auf die Zellkultur war bei allen Mutationen erfolgreich, außer bei der UL97 Mutation S512Stop. Diese Mutation konnte auch bei dem ursprünglichen Patienten nur ein einziges Mal nachgewiesen werden (Houldcroft et al., 2016), sodass es wahrscheinlich ist, dass die Mutation UL97 S512Stop die Replikation von HCMV so stark einschränkt, dass ein weiteres Wachstum verhindert wird.

Da das Wachstumsverhalten einen großen Einfluss auf die Behandlung von HCMV haben kann, wurden die Einzel- und Doppelmutationen mit Hilfe von Ein-Schritt-Wachstumszyklen untersucht. Hierbei zeigte sich eine mögliche Wachstumshemmung der UL97-Mutation I429F.

Ob die einzelnen Mutationen und Doppelmutationen, die in dieser Arbeit charakterisiert werden sollten, resistenzauslösend sind, wurde über Plaquereduktionsassays bestimmt. Hierbei zeigten sich die Einzelmutationen UL54 P522Q und UL97 C480F jeweils sensibel gegenüber von Ganciclovir, Cidofovir und Foscarnet. Die Doppelmutation UL54 P522Q / UL97 C480F zeigte jedoch eine Ganciclovir- und möglicherweise auch eine Foscarnetresistenz. Dieses Phänomen sollte in weiteren Arbeiten genauer untersucht werden. Die UL97 Mutation I429F bewirkte eine Ganciclovirresistenz. Die Einzelmutation UL54 V715M wurde schon von Cihlar et al. als foscarnetresistent beschrieben (Cihlar et al., 1998). Bei UL97 L595S handelt es sich um eine der häufigsten Mutationen, die eine Ganciclovirresistenz verursachen (Wolf et al., 1995). In der Kombination wurden die beiden Mutationen in dieser Arbeit beschrieben und wie zu erwarten, zeigte auch die Doppelmutation eine Ganciclovir- und eine Foscarnetresistenz.

## 6 Literaturverzeichnis

- ABATE, D. A., WATANABE, S. & MOCARSKI, E. S. 2004. Major human cytomegalovirus structural protein pp65 (ppUL83) prevents interferon response factor 3 activation in the interferon response. *J Virol*, 78, 10995-1006.
- ALBRECHT, T. & WELLER, T. H. 1980. Heterogeneous Morphologic Features of Plaques Induced by Five Strains of Human Cytomegalovirus. *American Journal of Clinical Pathology*, 73, 648-654.
- 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, e1002878.
- ANDREI, G., DE CLERCQ, E. & SNOECK, R. 2009. Viral DNA Polymerase Inhibitors. In: RANEY, K. D., GOTTE, M. & CAMERON, C. E. (eds.) *Viral Genome Replication*. Boston, MA: Springer US.
- ARIZA-HEREDIA, E. J., NESHER, L. & CHEMALY, R. F. 2014. Cytomegalovirus diseases after hematopoietic stem cell transplantation: a mini-review. *Cancer Lett*, 342, 1-8.
- BESWICK, T. S. 1962. The origin and the use of the word herpes. *Medical history*, 6, 214-232.
- BIRON, K. K. 2006. Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases. *Antiviral Res*, 71, 154-63.
- BIRON, K. K., STANAT, S. C., SORRELL, J. B., FYFE, J. A., KELLER, P. M., LAMBE, C. U. & NELSON, D. J. 1985. Metabolic activation of the nucleoside analog 9-[(2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy)methyl]guanine in human diploid fibroblasts infected with human cytomegalovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82, 2473-2477.
- BOPPANA, S. & FOWLER, K. 2007. HCMV: Persistence in the population: Epidemiology and transmission. In: ARVIN, A., CAMPADELLI-FIUME, G., MOCARSKI, E., MOORE, P. S., ROIZMAN, B., WHITLEY, R. & YAMANISHI, K. (eds.) *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge University Press.
- BORST, E. M., HAHN, G., KOSZINOWSKI, U. H. & MESSERLE, M. 1999. Cloning of the human cytomegalovirus (HCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*: a new approach for construction of HCMV mutants. *J Virol*, 73, 8320-9.
- BORST, E. M., KLEINE-ALBERS, J., GABAEV, I., BABIĆ, M., WAGNER, K., BINZ, A., DEGENHARDT, I., KALESSE, M., JONJIĆ, S., BAUERFEIND, R. & MESSERLE, M. 2013. The Human Cytomegalovirus UL51 Protein Is Essential for Viral Genome Cleavage-Packaging and Interacts with the Terminase Subunits pUL56 and pUL89. *Journal of Virology*, 87, 1720.
- BRITT, W. 2007. Virus entry into host, establishment of infection, spread in host, mechanisms of tissue damage. In: ARVIN, A., CAMPADELLI-FIUME, G., MOCARSKI, E., MOORE, P. S., ROIZMAN, B., WHITLEY, R. & YAMANISHI, K. (eds.) *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge University Press.
- BUONSENSO, D., SERRANTI, D., GARGIULLO, L., CECCARELLI, M., RANNO, O. & VALENTINI, P. 2012. Congenital cytomegalovirus infection: current strategies and future perspectives. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 16, 919-35.
- BUXMANN, H., HAMPRECHT, K., MEYER-WITTKOPF, M. & FRIESE, K. 2017a. Primary Human Cytomegalovirus (HCMV) Infection in Pregnancy. *Dtsch Arztebl Int*, 114, 45-52.
- BUXMANN, H., HAMPRECHT, K., MEYER-WITTKOPF, M. & FRIESE, K. 2017b. Zytomegalievirus-Primärinfektion in der Schwangerschaft. *Dtsch Arztebl International*, 114, 45-52.

- CAMPOS, A. B., RIBEIRO, J., BOUTOLLEAU, D. & SOUSA, H. 2016. Human cytomegalovirus antiviral drug resistance in hematopoietic stem cell transplantation: current state of the art. *Rev Med Virol*, 26, 161-82.
- CAPOSIO, P., D. STREBLOW, AND J. NELSON 2013. Cytomegalovirus proteomics. In: REDDEHASE, M. J. (ed.) *Cytomegaloviruses: From Molecular Pathogenesis to Intervention* Caister Academic Press.
- CHEMALY, R. F., ULLMANN, A. J., STOELBEN, S., RICHARD, M. P., BORNHÄUSER, M., GROTH, C., EINSELE, H., SILVERMAN, M., MULLANE, K. M., BROWN, J., NOWAK, H., KÖLLING, K., STOBERNACK, H. P., LISCHKA, P., ZIMMERMANN, H., RÜBSAMEN-SCHAEFF, H., CHAMPLIN, R. E. & EHNINGER, G. 2014. Letemovir for Cytomegalovirus Prophylaxis in Hematopoietic-Cell Transplantation. *New England Journal of Medicine*, 370, 1781-1789.
- CHENG, Y. C., HUANG, E. S., LIN, J. C., MAR, E. C., PAGANO, J. S., DUTSCHMAN, G. E. & GRILL, S. P. 1983. UNIQUE SPECTRUM OF ACTIVITY OF 9- (1,3-DIHYDROXY-2-PROPOXY)METHYL - GUANINE AGAINST HERPESVIRUSES INVITRO AND ITS MODE OF ACTION AGAINST HERPES-SIMPLEX VIRUS TYPE-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*, 80, 2767-2770.
- CHOU, S. 2015a. Approach to drug-resistant cytomegalovirus in transplant recipients. *Current opinion in infectious diseases*, 28, 293-299.
- CHOU, S. 2015b. Rapid In Vitro Evolution of Human Cytomegalovirus UL56 Mutations That Confer Letemovir Resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 59, 6588-93.
- CHOU, S., LURAIN, N. S., WEINBERG, A., CAI, G. Y., SHARMA, P. L. & CRUMPACKER, C. S. 1999. Interstrain variation in the human cytomegalovirus DNA polymerase sequence and its effect on genotypic diagnosis of antiviral drug resistance. Adult AIDS Clinical Trials Group CMV Laboratories. *Antimicrob Agents Chemother*, 43, 1500-2.
- CHOU, S., MAROUSEK, G. I., VAN WECHEL, L. C., LI, S. & WEINBERG, A. 2007. Growth and drug resistance phenotypes resulting from cytomegalovirus DNA polymerase region III mutations observed in clinical specimens. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51, 4160-4162.
- CHOU, S., SATTERWHITE, L. E. & ERCOLANI, R. J. 2018. New Locus of Drug Resistance in the Human Cytomegalovirus UL56 Gene Revealed by In Vitro Exposure to Letemovir and Ganciclovir. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 62, e00922-18.
- CHOU, S., WALDEMER, R. H., SENTERS, A. E., MICHELS, K. S., KEMBLE, G. W., MINER, R. C. & DREW, W. L. 2002. Cytomegalovirus UL97 phosphotransferase mutations that affect susceptibility to ganciclovir. *J Infect Dis*, 185, 162-9.
- CHRISP, P. & CLISSOLD, S. P. 1991. Foscarnet. A review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use in immunocompromised patients with cytomegalovirus retinitis. *Drugs*, 41, 104-29.
- CIHLAR, T. & CHEN, M. S. 1996. Identification of enzymes catalyzing two-step phosphorylation of cidofovir and the effect of cytomegalovirus infection on their activities in host cells. *Mol Pharmacol*, 50, 1502-10.
- CIHLAR, T., FULLER, M. D. & CHERRINGTON, J. M. 1998. Characterization of drug resistance-associated mutations in the human cytomegalovirus DNA polymerase gene by using recombinant mutant viruses generated from overlapping DNA fragments. *Journal of virology*, 72, 5927-5936.
- COMPTON, T., NEPOMUCENO, R. R. & NOWLIN, D. M. 1992. Human cytomegalovirus penetrates host cells by PH-independent fusion at the cell surface. *Virology*, 191, 387-395.

- COMPTON, T., NOWLIN, D. M. & COOPER, N. R. 1993. Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology*, 193, 834-41.
- CRAIG, J. M., MACAULEY, J. C., WELLER, T. H. & WIRTH, P. 1957. Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illnesses resembling cytomegalic inclusion disease. *Proc Soc Exp Biol Med*, 94, 4-12.
- CRUZ-MUNOZ, M. E. & FUENTES-PANANA, E. M. 2017. Beta and Gamma Human Herpesviruses: Agonistic and Antagonistic Interactions with the Host Immune System. *Front Microbiol*, 8, 2521.
- CUI, X., LEE, R., ADLER, S. P. & MCVOY, M. A. 2013. Antibody inhibition of human cytomegalovirus spread in epithelial cell cultures. *J Virol Methods*, 192, 44-50.
- DAVISON, A. 2007. *Overview of classification*, Cambridge, Cambridge University Press.
- DOLLARD, S. C., GROSSE, S. D. & ROSS, D. S. 2007. New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection. *Reviews in Medical Virology*, 17, 355-363.
- DONG, S.-W., JIAO, L.-S., YANG, M., DUAN, Y.-L., CHEN, Y.-B., ZHAO, F., ZHANG, A. M., LIU, L., LUO, M.-H. & XIA, X.-S. 2018. Primary Tree Shrew Dermis Fibroblasts Support Lytic Replication of Human Cytomegalovirus. Preprints.
- DUNN, K. C., AOTAKI-KEEN, A. E., PUTKEY, F. R. & HJELMELAND, L. M. 1996. ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Exp Eye Res*, 62, 155-69.
- DUPONT, L. & REEVES, M. B. 2016. Cytomegalovirus latency and reactivation: recent insights into an age old problem. *Rev Med Virol*, 26, 75-89.
- EL CHAER, F., SHAH, D. P. & CHEMALY, R. F. 2016. How I treat resistant cytomegalovirus infection in hematopoietic cell transplantation recipients. *Blood*, 128, 2624-2636.
- EL HELOU, G. & RAZONABLE, R. R. 2019. Safety considerations with current and emerging antiviral therapies for cytomegalovirus infection in transplantation. *Expert Opin Drug Saf*, 18, 1017-1030.
- EMERY, V. C. 1999. Viral dynamics during active cytomegalovirus infection and pathology. *Intervirology*, 42, 405-11.
- ENDERS, G., DAIMINGER, A., BADER, U., EXLER, S. & ENDERS, M. 2011. Intrauterine transmission and clinical outcome of 248 pregnancies with primary cytomegalovirus infection in relation to gestational age. *J Clin Virol*, 52, 244-6.
- ERB-ZOHAR, K., KROPEIT, D., SCHEUENPFLUG, J., STOBERNACK, H. P., HULSKOTTE, E. G. J., VAN SCHANKE, A., ZIMMERMANN, H. & RÜBSAMEN-SCHAEFF, H. 2017. Intravenous Hydroxypropyl  $\beta$ -Cyclodextrin Formulation of Letemovir: A Phase I, Randomized, Single-Ascending, and Multiple-Dose Trial. *Clinical and Translational Science*, 10, 487-495.
- FEIRE, A. L., ROY, R. M., MANLEY, K. & COMPTON, T. 2010. The glycoprotein B disintegrin-like domain binds beta 1 integrin to mediate cytomegalovirus entry. *J Virol*, 84, 10026-37.
- FIELD, A. K., DAVIES, M. E., DEWITT, C., PERRY, H. C., LIOU, R., GERMERSHAUSEN, J., KARKAS, J. D., ASHTON, W. T., JOHNSTON, D. B. & TOLMAN, R. L. 1983. 9-([2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy]methyl)guanine: a selective inhibitor of herpes group virus replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80, 4139-4143.
- 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. Tübingen: Eberhard Karls Universität

- FRASCAROLI, G., LECHER, C., VARANI, S., SETZ, C., VAN DER MERWE, J., BRUNE, W. & MERTENS, T. 2018. Human Macrophages Escape Inhibition of Major Histocompatibility Complex-Dependent Antigen Presentation by Cytomegalovirus and Drive Proliferation and Activation of Memory CD4(+) and CD8(+) T Cells. *Front Immunol*, 9, 1129.
- FU, T. M., AN, Z. & WANG, D. 2014. Progress on pursuit of human cytomegalovirus vaccines for prevention of congenital infection and disease. *Vaccine*, 32, 2525-33.
- GENTRY, B. G., BOGNER, E. & DRACH, J. C. 2019. Targeting the terminase: An important step forward in the treatment and prophylaxis of human cytomegalovirus infections. *Antiviral Res*, 161, 116-124.
- GERNA, G. & LILLERI, D. 2019. Human cytomegalovirus (HCMV) infection/re-infection: development of a protective HCMV vaccine. *New Microbiol*, 42, 1-20.
- GIBSON, W. 2008. Structure and formation of the cytomegalovirus virion. *Curr Top Microbiol Immunol*, 325, 187-204.
- GILBERT, C. & BOIVIN, G. 2005a. Human Cytomegalovirus Resistance to Antiviral Drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 873-883.
- GILBERT, C. & BOIVIN, G. 2005b. Human cytomegalovirus resistance to antiviral drugs. *Antimicrob Agents Chemother*, 49, 873-83.
- GODERIS, J., DE LEENHEER, E., SMETS, K., VAN HOECKE, H., KEYMEULEN, A. & DHOOGHE, I. 2014. Hearing loss and congenital CMV infection: a systematic review. *Pediatrics*, 134, 972-82.
- GOODPASTURE, E. W. & TALBOT, F. B. 1921. CONCERNING THE NATURE OF "PROTOZOAN-LIKE" CELLS IN CERTAIN LESIONS OF INFANCY. *American Journal of Diseases of Children*, 21, 415-425.
- GOODRUM, F. 2016. Human Cytomegalovirus Latency: Approaching the Gordian Knot. *Annu Rev Virol*, 3, 333-357.
- GRATTAN, M. T., MORENO-CABRAL, C. E., STARNES, V. A., OYER, P. E., STINSON, E. B. & SHUMWAY, N. E. 1989. Cytomegalovirus infection is associated with cardiac allograft rejection and atherosclerosis. *Jama*, 261, 3561-6.
- GRIFFITHS, P., BARANIAK, I. & REEVES, M. 2015. The pathogenesis of human cytomegalovirus. *The Journal of Pathology*, 235, 288-297.
- HALL SEDLAK, R., CASTOR, J., BUTLER-WU, S. M., CHAN, E., COOK, L., LIMAYE, A. P. & JEROME, K. R. 2013. Rapid detection of human cytomegalovirus UL97 and UL54 mutations directly from patient samples. *Journal of clinical microbiology*, 51, 2354-2359.
- HAMILTON, S. T., MILBRADT, J., MARSCHALL, M. & RAWLINSON, W. D. 2014. Human cytomegalovirus replication is strictly inhibited by siRNAs targeting UL54, UL97 or UL122/123 gene transcripts. *PloS one*, 9, e97231-e97231.
- HAMPRECHT, K. & JAHN, G. 2007. Humanes Cytomegalovirus und kongenitale Infektion. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 50, 1379-1392.
- HAMPRECHT, K., MASCHMANN, J., VOICHEM, M., DIETZ, K., SPEER, C. P. & JAHN, G. 2001. Epidemiology of transmission of cytomegalovirus from mother to preterm infant by breastfeeding. *Lancet*, 357, 513-8.
- HIERHOLZER, J. C. & KILLINGTON, R. A. 1996. Virus isolation and quantitation. *Virology Methods Manual*, 25-46.
- HO, M. 2008. The history of cytomegalovirus and its diseases. *Medical Microbiology and Immunology*, 197, 65-73.
- HONESS, R. W. & ROIZMAN, B. 1974. Regulation of Herpesvirus Macromolecular Synthesis I. Cascade Regulation of the Synthesis of Three Groups of Viral Proteins. *Journal of Virology*, 14, 8.
- HOULDCROFT, C. J., BRYANT, J. M., DEPLEDGE, D. P., MARGETTS, B. K., SIMMONDS, J., NICOLAOU, S., TUTILL, H. J., WILLIAMS, R., WORTH, A. J., MARKS, S. D., VEYS, P.,

- WHITTAKER, E. & BREUER, J. 2016. Detection of Low Frequency Multi-Drug Resistance and Novel Putative Maribavir Resistance in Immunocompromised Pediatric Patients with Cytomegalovirus. *Front Microbiol*, 7, 1317.
- IBANEZ, C. E., SCHRIER, R., GHAZAL, P., WILEY, C. & NELSON, J. A. 1991. Human cytomegalovirus productively infects primary differentiated macrophages. *J Virol*, 65, 6581-8.
- IHARA, S., SAITO, S. & WATANABE, Y. 1982. Suppression of fibronectin synthesis by an early function(s) of human cytomegalovirus. *J Gen Virol*, 59, 409-13.
- ISAACSON, M. K., JUCKEM, L. K. & COMPTON, T. 2008. Virus entry and innate immune activation. *Curr Top Microbiol Immunol*, 325, 85-100.
- JACOBSON, M. A., WILSON, S., STANLEY, H., HOLTZER, C., CHERRINGTON, J. & SAFRIN, S. 1999. Phase I study of combination therapy with intravenous cidofovir and oral ganciclovir for cytomegalovirus retinitis in patients with AIDS. *Clin Infect Dis*, 28, 528-33.
- JEAN BELTRAN, P. M. & CRISTEA, I. M. 2014. The life cycle and pathogenesis of human cytomegalovirus infection: lessons from proteomics. *Expert review of proteomics*, 11, 697-711.
- KABANOVA, A., MARCANDALLI, J., ZHOU, T., BIANCHI, S., BAXA, U., TSYBOVSKY, Y., LILLERI, D., SILACCI-FREGNI, C., FOGIERINI, M., FERNANDEZ-RODRIGUEZ, B. M., DRUZ, A., ZHANG, B., GEIGER, R., PAGANI, M., SALLUSTO, F., KWONG, P. D., CORTI, D., LANZAVECCHIA, A. & PEREZ, L. 2016. Platelet-derived growth factor- $\alpha$  receptor is the cellular receptor for human cytomegalovirus gHgLgO trimer. *Nature microbiology*, 1, 16082-16082.
- KAGAN, K. O., ENDERS, M., SCHAMPERA, M. S., BAEUMEL, E., HOOPMANN, M., GEIPEL, A., BERG, C., GOELZ, R., DE CATTE, L., WALLWIENER, D., BRUCKER, S., ADLER, S. P., JAHN, G. & HAMPRECHT, K. 2019. Prevention of maternal-fetal transmission of cytomegalovirus after primary maternal infection in the first trimester by biweekly hyperimmunoglobulin administration. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 53, 383-389.
- KALEJTA, R. F. 2008a. Functions of human cytomegalovirus tegument proteins prior to immediate early gene expression. *Curr Top Microbiol Immunol*, 325, 101-15.
- KALEJTA, R. F. 2008b. Tegument proteins of human cytomegalovirus. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 72, 249-265.
- KAZORY, A., SINGAPURI, S., WADHWA, A. & EJAZ, A. A. 2007. Simultaneous development of Fanconi syndrome and acute renal failure associated with cidofovir. *J Antimicrob Chemother*, 60, 193-4.
- KIMBERLIN, D. W., JESTER, P. M., SÁNCHEZ, P. J., AHMED, A., ARAV-BOGER, R., MICHAELS, M. G., ASHOURI, N., ENGLUND, J. A., ESTRADA, B., JACOBS, R. F., ROMERO, J. R., SOOD, S. K., WHITWORTH, M. S., ABZUG, M. J., CASERTA, M. T., FOWLER, S., LUJAN-ZILBERMANN, J., STORCH, G. A., DEBIASI, R. L., HAN, J.-Y., PALMER, A., WEINER, L. B., BOCCHINI, J. A., DENNEHY, P. H., FINN, A., GRIFFITHS, P. D., LUCK, S., GUTIERREZ, K., HALASA, N., HOMANS, J., SHANE, A. L., SHARLAND, M., SIMONSEN, K., VANCHIERE, J. A., WOODS, C. R., SABO, D. L., ABAN, I., KUO, H., JAMES, S. H., PRICHARD, M. N., GRIFFIN, J., GILES, D., ACOSTA, E. P. & WHITLEY, R. J. 2015. Valganciclovir for Symptomatic Congenital Cytomegalovirus Disease. *New England Journal of Medicine*, 372, 933-943.
- KROSKY, P. M., BAEK, M. C., JAHNG, W. J., BARRERA, I., HARVEY, R. J., BIRON, K. K., COEN, D. M. & SETHNA, P. B. 2003. The human cytomegalovirus UL44 protein is a substrate for the UL97 protein kinase. *J Virol*, 77, 7720-7.
- KUESSEL, L., HUSSLEIN, H., MARSCHALEK, J., BRUNNER, J., RISTL, R., POPOW-KRAUPP, T. & KISS, H. 2015. Prediction of Maternal Cytomegalovirus Serostatus in Early Pregnancy: A Retrospective Analysis in Western Europe. *PLoS One*, 10, e0145470.

- LAI, L., XU, Z., ZHOU, J., LEE, K.-D. & AMIDON, G. L. 2008. Molecular Basis of Prodrug Activation by Human Valacyclovirase, an  $\alpha$ -Amino Acid Ester Hydrolase. *The Journal of Biological Chemistry*, 283, 9318-9327.
- LERUEZ-VILLE, M., GHOUT, I., BUSSIERES, L., STIRNEMANN, J., MAGNY, J. F., COUDERC, S., SALOMON, L. J., GUILLEMINOT, T., AEGERTER, P., BENOIST, G., WINER, N., PICONE, O., JACQUEMARD, F. & VILLE, Y. 2016. In utero treatment of congenital cytomegalovirus infection with valacyclovir in a multicenter, open-label, phase II study. *Am J Obstet Gynecol*, 215, 462.e1-462.e10.
- LI, T., CHEN, J. & CRISTEA, I. M. 2013. Human cytomegalovirus tegument protein pUL83 inhibits IFI16-mediated DNA sensing for immune evasion. *Cell host & microbe*, 14, 591-599.
- LIGAT, G., CAZAL, R., HANTZ, S. & ALAIN, S. 2018. The human cytomegalovirus terminase complex as an antiviral target: a close-up view. *FEMS microbiology reviews*, 42, 137-145.
- LITTLER, E., STUART, A. D. & CHEE, M. S. 1992a. Human cytomegalovirus UL97 open reading frame encodes a protein that phosphorylates the antiviral nucleoside analogue ganciclovir. *Nature*, 358, 160-2.
- LITTLER, E., STUART, A. D. & CHEE, M. S. 1992b. Human cytomegalovirus UL97 open reading frame encodes a protein that phosphorylates the antiviral nucleoside analogue ganciclovir. *Nature*, 358, 160.
- LIU & ZHOU 2007. Comparative virion structures of human herpesviruses. In: ARVIN, A., CAMPADELLI-FIUME, G., MOCARSKI, E., MOORE, P. S., ROIZMAN, B., WHITLEY, R. & YAMANISHI, K. (eds.) *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge University Press.
- LJUNGMAN, P., BOECKH, M., HIRSCH, H. H., JOSEPHSON, F., LUNDGREN, J., NICHOLS, G., PIKIS, A., RAZONABLE, R. R., MILLER, V. & GRIFFITHS, P. D. 2017. Definitions of Cytomegalovirus Infection and Disease in Transplant Patients for Use in Clinical Trials. *Clin Infect Dis*, 64, 87-91.
- LJUNGMAN, P., GRIFFITHS, P. & PAYA, C. 2002. Definitions of Cytomegalovirus Infection and Disease in Transplant Recipients. *Clinical Infectious Diseases*, 34, 1094-1097.
- LUDWIG, A. & HENGEL, H. 2009. Epidemiological impact and disease burden of congenital cytomegalovirus infection in Europe. *Euro Surveill*, 14, 26-32.
- LURAIN, N. S. & CHOU, S. 2010. Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev*, 23, 689-712.
- MAERTENS, J., CORDONNIER, C., JAKSCH, P., POIRÉ, X., UKNIS, M., WU, J., WIJATYK, A., SALIBA, F., WITZKE, O. & VILLANO, S. 2019. Maribavir for Preemptive Treatment of Cytomegalovirus Reactivation. *New England Journal of Medicine*, 381, 1136-1147.
- MANICKLAL, S., EMERY, V. C., LAZZAROTTO, T., BOPPANA, S. B. & GUPTA, R. K. 2013. The "silent" global burden of congenital cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev*, 26, 86-102.
- MARSCHALL, M., STEIN-GERLACH, M., FREITAG, M., KUPFER, R., VAN DEN BOGAARD, M. & STAMMINGER, T. 2002. Direct targeting of human cytomegalovirus protein kinase pUL97 by kinase inhibitors is a novel principle for antiviral therapy. *J Gen Virol*, 83, 1013-23.
- MARTIN, J. C., DVORAK, C. A., SMEE, D. F., MATTHEWS, T. R. & VERHEYDEN, J. P. H. 1983. 9-(1,3-DIHYDROXY-2-PROPOXY)METHYL GUANINE - A NEW POTENT AND SELECTIVE ANTIHERPES AGENT. *Journal of Medicinal Chemistry*, 26, 759-761.
- MARTINEZ-MARTIN, N., MARCANDALLI, J., HUANG, C. S., ARTHUR, C. P., PEROTTI, M., FOGlierINI, M., HO, H., DOSEY, A. M., SHRIVER, S., PAYANDEH, J., LEITNER, A., LANZAVECCHIA, A., PEREZ, L. & CIFERRI, C. 2018. An Unbiased Screen for Human Cytomegalovirus Identifies Neuropilin-2 as a Central Viral Receptor. *Cell*, 174, 1158-1171.e19.

- MARTY, F. M., LJUNGMAN, P., CHEMALY, R. F., MAERTENS, J., DADWAL, S. S., DUARTE, R. F., HAIDER, S., ULLMANN, A. J., KATAYAMA, Y., BROWN, J., MULLANE, K. M., BOECKH, M., BLUMBERG, E. A., EINSELE, H., SNYDMAN, D. R., KANDA, Y., DINUBILE, M. J., TEAL, V. L., WAN, H., MURATA, Y., KARTSONIS, N. A., LEAVITT, R. Y. & BADSHAH, C. 2017a. Letermovir Prophylaxis for Cytomegalovirus in Hematopoietic-Cell Transplantation. *N Engl J Med*, 377, 2433-2444.
- MARTY, F. M., LJUNGMAN, P., CHEMALY, R. F., MAERTENS, J., DADWAL, S. S., DUARTE, R. F., HAIDER, S., ULLMANN, A. J., KATAYAMA, Y., BROWN, J., MULLANE, K. M., BOECKH, M., BLUMBERG, E. A., EINSELE, H., SNYDMAN, D. R., KANDA, Y., DINUBILE, M. J., TEAL, V. L., WAN, H., MURATA, Y., KARTSONIS, N. A., LEAVITT, R. Y. & BADSHAH, C. 2017b. Letermovir Prophylaxis for Cytomegalovirus in Hematopoietic-Cell Transplantation. *New England Journal of Medicine*, 377, 2433-2444.
- MELENDEZ, D. P. & RAZONABLE, R. R. 2015. Letermovir and inhibitors of the terminase complex: a promising new class of investigational antiviral drugs against human cytomegalovirus. *Infect Drug Resist*, 8, 269-77.
- MEYER-WITTKOPF, M., BUXMANN, H., GONSER, M. & HAMPRECHT, K. 2009. Neues zur prä- und perinatalen Cytomegalovirus-Infektion. *Frauenarzt*, 50, 524 - 527
- MYERSON, D., HACKMAN, R. C., NELSON, J. A., WARD, D. C. & MCDOUGALL, J. K. 1984. Widespread presence of histologically occult cytomegalovirus. *Hum Pathol*, 15, 430-9.
- NELSON, C. S., JENKS, J. A., PARDI, N., GOODWIN, M., ROARK, H., EDWARDS, W., MCLELLAN, J. S., POLLARA, J., WEISSMAN, D. & PERMAR, S. R. 2020. Human Cytomegalovirus Glycoprotein B Nucleoside-Modified mRNA Vaccine Elicits Antibody Responses with Greater Durability and Breadth than MF59-Adjuvanted gB Protein Immunization. *Journal of virology*, 94, e00186-20.
- NGUYEN, C. C. & KAMIL, J. P. 2018. Pathogen at the Gates: Human Cytomegalovirus Entry and Cell Tropism. *Viruses*, 10, 704.
- OGAWA-GOTO, K., TANAKA, K., GIBSON, W., MORIISHI, E., MIURA, Y., KURATA, T., IRIE, S. & SATA, T. 2003. Microtubule network facilitates nuclear targeting of human cytomegalovirus capsid. *Journal of virology*, 77, 8541-8547.
- PESCOVITZ, M. D., RABKIN, J., MERION, R. M., PAYA, C. V., PIRSCH, J., FREEMAN, R. B., O'GRADY, J., ROBINSON, C., TO, Z., WREN, K., BANKEN, L., BUHLES, W. & BROWN, F. 2000. Valganciclovir Results in Improved Oral Absorption of Ganciclovir in Liver Transplant Recipients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, 2811-2815.
- PIRET, J. & BOIVIN, G. 2019. Clinical development of letermovir and maribavir: Overview of human cytomegalovirus drug resistance. *Antiviral Res*, 163, 91-105.
- PRICHARD, M. N. 2009. Function of human cytomegalovirus UL97 kinase in viral infection and its inhibition by maribavir. *Rev Med Virol*, 19, 215-29.
- PRICHARD, M. N., GAO, N., JAIRATH, S., MULAMBA, G., KROSKY, P., COEN, D. M., PARKER, B. O. & PARI, G. S. 1999. A recombinant human cytomegalovirus with a large deletion in UL97 has a severe replication deficiency. *J Virol*, 73, 5663-70.
- RAZONABLE, R. R. & HUMAR, A. 2019. Cytomegalovirus in solid organ transplant recipients— Guidelines of the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. *Clinical Transplantation*, 33, e13512.
- REDDEHASE, M. J. 2002. Antigens and immunoevasins: opponents in cytomegalovirus immune surveillance. *Nature Reviews Immunology*, 2, 831.
- REEVES, M. B. & SINCLAIR, J. H. 2013. Circulating dendritic cells isolated from healthy seropositive donors are sites of human cytomegalovirus reactivation in vivo. *J Virol*, 87, 10660-7.

- REVELLO, M. G., FORNARA, C., AROSSA, A., ZELINI, P. & LILLERI, D. 2014. Role of human cytomegalovirus (HCMV)-specific antibody in HCMV-infected pregnant women. *Early Human Development*, 90, S32-S34.
- RIBBERT, H. 1904. Über proofoanartige Zellen in der Niere eines syphilitischen Neugeborenen und in der Parotis von Kindern. *Zentralbl Allg Pathol* 15, 945-948.
- RUBIN, R. H. 1990. Impact of Cytomegalovirus Infection on Organ Transplant Recipients. *Reviews of Infectious Diseases*, 12, S754-S766.
- SAFFERT, R. T. & KALEJTA, R. F. 2007. Human Cytomegalovirus Gene Expression Is Silenced by Daxx-Mediated Intrinsic Immune Defense in Model Latent Infections Established In Vitro. *Journal of Virology*, 81, 9109.
- SAMPAIO, K. L., CAVIGNAC, Y., STIERHOF, Y. D. & SINZGER, C. 2005. Human cytomegalovirus labeled with green fluorescent protein for live analysis of intracellular particle movements. *J Virol*, 79, 2754-67.
- SAUER, A., WANG, J. B., HAHN, G. & MCVOY, M. A. 2010. A human cytomegalovirus deleted of internal repeats replicates with near wild type efficiency but fails to undergo genome isomerization. *Virology*, 401, 90-95.
- SCHREIBER, A., HARTER, G., SCHUBERT, A., BUNJES, D., MERTENS, T. & MICHEL, D. 2009. Antiviral treatment of cytomegalovirus infection and resistant strains. *Expert Opin Pharmacother*, 10, 191-209.
- SINCLAIR, J. 2008. Human cytomegalovirus: Latency and reactivation in the myeloid lineage. *J Clin Virol*, 41, 180-5.
- SINZGER, C. 2008. Entry route of HCMV into endothelial cells. *Journal of Clinical Virology*, 41, 174-179.
- SINZGER, C., HAHN, G., DIGEL, M., KATONA, R., SAMPAIO, K. L., MESSERLE, M., HENGEL, H., KOSZINOWSKI, U., BRUNE, W. & ADLER, B. 2008. Cloning and sequencing of a highly productive, endotheliotropic virus strain derived from human cytomegalovirus TB40/E. *J Gen Virol*, 89, 359-68.
- SINZGER, C., KAHL, M., LAIB, K., KLINGEL, K., RIEGER, P., PLACHTER, B. & JAHN, G. 2000. Tropism of human cytomegalovirus for endothelial cells is determined by a post-entry step dependent on efficient translocation to the nucleus. *Journal of General Virology*, 81, 3021-3035.
- SISSONS, J. G. & WILLS, M. R. 2015. How understanding immunology contributes to managing CMV disease in immunosuppressed patients: now and in future. *Med Microbiol Immunol*, 204, 307-16.
- SMITH, I. L., CHERRINGTON, J. M., JILES, R. E., FULLER, M. D., FREEMAN, W. R. & SPECTOR, S. A. 1997. High-level resistance of cytomegalovirus to ganciclovir is associated with alterations in both the UL97 and DNA polymerase genes. *J Infect Dis*, 176, 69-77.
- 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, 424-30.
- SODEIK, B., MESSERLE, M. & SCHULZ, T. F. 2016. Herpesviren. In: SUERBAUM, S., BURCHARD, G.-D., KAUFMANN, S. H. E. & SCHULZ, T. F. (eds.) *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- STARAS, S. A., FLANDERS, W. D., DOLLARD, S. C., PASS, R. F., MCGOWAN, J. E., JR. & CANNON, M. J. 2008. Cytomegalovirus seroprevalence and childhood sources of infection: A population-based study among pre-adolescents in the United States. *J Clin Virol*, 43, 266-71.
- STEGMANN, C., HOCHDORFER, D., LIEBER, D., SUBRAMANIAN, N., STÖHR, D., LAIB SAMPAIO, K. & SINZGER, C. 2017. A derivative of platelet-derived growth factor receptor alpha binds to the trimer of human cytomegalovirus and inhibits entry into fibroblasts and endothelial cells. *PLoS pathogens*, 13, e1006273-e1006273.

- STEININGER, C. 2007. Clinical relevance of cytomegalovirus infection in patients with disorders of the immune system. *Clinical Microbiology and Infection*, 13, 953-963.
- SUGAWARA, M., HUANG, W., FEI, Y. J., LEIBACH, F. H., GANAPATHY, V. & GANAPATHY, M. E. 2000. Transport of Valganciclovir, a Ganciclovir Prodrug, via Peptide Transporters PEPT1 and PEPT2. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 89, 781-789.
- TANDON, R. & MOCARSKI, E. S. 2012. Viral and host control of cytomegalovirus maturation. *Trends in microbiology*, 20, 392-401.
- TAYLOR, G. H. 2003. Cytomegalovirus. *Am Fam Physician*, 67, 519-24.
- TISCHER, B. K., SMITH, G. A. & OSTERRIEDER, N. 2010. En passant mutagenesis: a two step markerless red recombination system. *Methods Mol Biol*, 634, 421-30.
- TISCHER, B. K., VON EINEM, J., KAUFER, B. & OSTERRIEDER, N. 2006. Two-step red-mediated recombination for versatile high-efficiency markerless DNA manipulation in *Escherichia coli*. *Biotechniques*, 40, 191-7.
- VARNUM, S. M., STREBLOW, D. N., MONROE, M. E., SMITH, P., AUBERRY, K. J., PASA-TOLIC, L., WANG, D., CAMP, D. G., 2ND, RODLAND, K., WILEY, S., BRITT, W., SHENK, T., SMITH, R. D. & NELSON, J. A. 2004. Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *J Virol*, 78, 10960-6.
- VON GLAHN, W. C. & PAPPENHEIMER, A. M. 1925. Intranuclear Inclusions in Visceral Disease. *The American journal of pathology*, 1, 445-466.3.
- WALLACE, P. R., JANET, W. H., SAMUEL, W., HORACE, C. T. & ROBERT, J. H. 1956. Cytopathogenic Agent Resembling Human Salivary Gland Virus Recovered from Tissue Cultures of Human Adenoids. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 92, 418-424.
- WARREN, A. P., OWENS, C. N., BORYSIEWICZ, L. K. & PATEL, K. 1994. Down-regulation of integrin alpha 1/beta 1 expression and association with cell rounding in human cytomegalovirus-infected fibroblasts. *J Gen Virol*, 75 ( Pt 12), 3319-25.
- WESTSTRATE, M. W., GEELEN, J. L. M. C. & VAN DER NOORDAA, J. 1980. Human Cytomegalovirus DNA: Physical Maps for the Restriction Endonucleases BglIII, HindIII and XbaI. *Journal of General Virology*, 49, 1-21.
- WILKINSON, G. W. G., DAVISON, A. J., TOMASEC, P., FIELDING, C. A., AICHELER, R., MURRELL, I., SEIRAFIAN, S., WANG, E. C. Y., WEEKES, M., LEHNER, P. J., WILKIE, G. S. & STANTON, R. J. 2015. Human cytomegalovirus: taking the strain. *Medical microbiology and immunology*, 204, 273-284.
- WILLIAMS, S. L., HARTLINE, C. B., KUSHNER, N. L., HARDEN, E. A., BIDANSET, D. J., DRACH, J. C., TOWNSEND, L. B., UNDERWOOD, M. R., BIRON, K. K. & KERN, E. R. 2003. In vitro activities of benzimidazole D- and L-ribonucleosides against herpesviruses. *Antimicrob Agents Chemother*, 47, 2186-92.
- WOLF, D. G., SMITH, I. L., LEE, D. J., FREEMAN, W. R., FLORES-AGUILAR, M. & SPECTOR, S. A. 1995. Mutations in human cytomegalovirus UL97 gene confer clinical resistance to ganciclovir and can be detected directly in patient plasma. *The Journal of Clinical Investigation*, 95, 257-263.
- WU, Y., PRAGER, A., BOOS, S., RESCH, M., BRIZIC, I., MACH, M., WILDNER, S., SCRIVANO, L. & ADLER, B. 2017. Human cytomegalovirus glycoprotein complex gH/gL/gO uses PDGFR- $\alpha$  as a key for entry. *PLoS pathogens*, 13, e1006281-e1006281.
- YU, Y., CLIPPINGER, A. J. & ALWINE, J. C. 2011. Viral effects on metabolism: changes in glucose and glutamine utilization during human cytomegalovirus infection. *Trends in microbiology*, 19, 360-367.
- YUROCHKO, A. D. 2008. Human cytomegalovirus modulation of signal transduction. *Curr Top Microbiol Immunol*, 325, 205-20.

- ZARROUK, K., PIRET, J. & BOIVIN, G. 2017. Herpesvirus DNA polymerases: Structures, functions and inhibitors. *Virus Res*, 234, 177-192.
- ZEDTWITZ-LIEBENSTEIN, K., DIAB-ELSCHAHAW, M. & FRASS, M. 2016. Human Cytomegalovirus Infection in Nonimmunocompromised Patients: A Retrospective Analysis and Review of the Literature. *Intervirolgy*, 59, 159-162.

## 7 Appendix

### 7.1 Appendix 1

Die UL54-Sequenz des bakteriellen artifiziiellen Chromosoms TB40-BACKL7-UL32EGFP. Alle Punktmutationen, die in dieser Arbeit charakterisiert wurden, sind in violett markiert, alle Sequenzierungsprimer in grün.

1	M	F	F	N	P	Y	L	S	G	G	V	T	G	A	A	V	16
1	ATG	TTT	TTC	AAC	CCG	TAT	CTG	AGC	GGC	GGC	GTG	ACC	GGC	GGT	GCG	GTC	48
17	A	G	G	R	R	Q	R	S	Q	P	G	S	A	Q	G	S	32
49	GCG	GGT	GGC	CGG	CGT	CAG	CGT	TCG	CAG	CCC	GGC	TCC	GCG	CAG	GGC	TCG	96
33	G	K	R	P	P	Q	K	Q	F	L	Q	I	V	P	R	G	48
97	GGC	AAG	CGG	CCG	CCA	CAG	AAA	CAG	TTT	TTG	CAG	ATC	GTG	CCG	CGA	GGC	144
49	G	M	F	D	G	Q	T	G	L	I	K	H	K	T	G	R	64
145	GTC	ATG	TTC	GAC	GGT	CAG	ACG	GGG	TTG	ATC	AAG	CAT	AAG	ACG	GGA	CGG	192
65	L	P	L	M	F	Y	R	E	I	K	H	L	L	S	H	D	80
193	CTG	CCT	CTC	ATG	TTC	TAT	CGA	GAG	ATT	AAA	CAT	TTG	TTG	AGT	CAT	GAC	240
81	M	V	W	P	C	P	W	R	E	T	L	V	G	R	V	V	96
241	ATG	GTT	TGG	CCG	TGT	CCT	TGG	CGC	GAG	ACC	CTG	GTG	GGT	CGC	GTG	GTG	288
97	G	P	I	R	F	H	T	Y	D	Q	T	D	A	V	L	F	112
289	GGA	CCT	ATT	CGT	TTT	CAC	ACC	TAC	GAT	CAG	ACG	GAC	GCC	GTG	CTC	TTC	336
113	F	D	S	P	E	N	V	S	P	R	Y	R	Q	H	L	V	128
337	TTC	GAC	TCG	CCC	GAA	AAC	GTG	TCG	CCG	CGC	TAT	CGT	CAG	CAT	CTG	GTG	384
129	P	S	G	N	V	L	R	F	F	G	A	T	E	H	G	Y	144
385	CCT	TCG	GGG	AAC	GTG	TTG	CGT	TTC	TTC	GGG	GCC	ACA	GAA	CAC	GGC	TAC	432
145	S	I	C	V	N	V	F	G	Q	R	S	Y	F	Y	C	E	160
433	AGT	ATC	TGC	GTC	AAC	GTT	TTC	GGG	CAG	CGC	AGC	TAC	TTT	TAC	TGT	GAG	480
161	Y	S	D	T	D	R	L	R	E	V	I	A	S	V	G	E	176
481	TAC	AGC	GAC	ACC	GAT	AGG	CTG	CGT	GAG	GTC	ATT	GCC	AGC	GTG	GGC	GAA	528
177	L	V	P	E	P	R	T	P	Y	A	V	S	V	T	P	A	192
529	CTA	GTG	CCC	GAA	CCG	CGG	ACG	CCA	TAC	GCC	GTG	TCT	GTC	ACG	CCG	GCC	576
193	T	K	T	S	I	Y	G	Y	G	T	R	P	V	P	D	L	208
577	ACC	AAA	ACC	TCG	ATC	TAC	GGG	TAC	GGG	ACG	CGA	CCC	GTG	CCC	GAT	TTG	624
209	Q	C	V	S	I	S	N	W	T	M	A	R	K	I	G	E	224
625	CAG	TGT	GTG	TCT	ATC	AGC	AAC	TGG	ACC	ATG	GCC	AGA	AAA	ATC	GGC	GAG	672
225	Y	L	L	E	Q	G	F	P	V	Y	E	V	R	V	D	P	240
673	TAT	CTG	CTG	GAG	CAG	GGT	TTT	CCC	GTG	TAC	GAG	GTC	CGT	GTG	GAT	CCG	720
241	L	T	R	L	V	I	D	R	R	I	T	T	F	G	W	C	256
721	CTG	ACG	CGT	TTG	GTC	ATC	GAT	CGG	CGG	ATC	ACC	ACG	TTC	GGC	TGG	TGC	768
257	S	V	N	R	Y	D	W	R	Q	Q	G	R	A	S	T	C	272
769	TCC	GTG	AAT	CGT	TAC	GAC	TGG	CGG	CAG	CAG	GGT	CGC	GCG	TCG	ACT	TGT	816

273	D	I	E	V	D	C	D	V	S	D	L	V	A	V	P	D	288
817	GAT	ATC	GAG	GTC	GAC	TGC	GAT	GTC	TCT	GAC	CTG	GTG	GCC	GTG	CCC	GAC	864
289	D	S	S	W	P	R	Y	R	C	L	S	F	D	I	E	C	304
865	GAC	AGC	TCG	TGG	CCG	CGC	TAT	CGA	TGC	CTG	TCC	TTC	GAT	ATC	GAG	TGC	912
305	M	S	G	E	G	G	F	P	C	A	E	K	S	D	D	I	320
913	ATG	AGC	GGC	GAG	GGT	GGT	TTT	CCC	TGC	GCC	GAG	AAG	TCC	GAT	GAC	ATT	960
321	V	I	Q	I	S	C	V	C	Y	E	T	G	G	N	T	A	336
961	GTC	ATT	CAG	ATC	TCG	TGC	GTG	TGC	TAC	GAG	ACG	GGG	GGA	AAC	ACC	GCC	1008
337	V	D	Q	G	I	P	N	G	N	D	G	R	G	C	T	S	352
1009	GTG	GAT	CAG	GGG	ATC	CCA	AAC	GGG	AAC	GAT	GGC	CGG	GGC	TGC	ACT	TCG	1056
353	E	G	V	I	F	G	H	S	G	L	H	L	F	T	I	G	368
1057	GAG	GGT	GTG	ATC	TTT	GGG	CAC	TCG	GGT	CTT	CAT	CTC	TTC	ACG	ATC	GGC	1104
369	T	C	G	Q	V	G	P	D	V	D	V	Y	E	F	P	S	384
1105	ACC	TGC	GGG	CAG	GTG	GGC	CCA	GAC	GTG	GAC	GTC	TAC	GAG	TTC	CCT	TCC	1152
385	E	Y	E	L	L	L	G	F	M	L	F	F	Q	R	Y	A	400
1153	GAA	TAC	GAG	CTG	CTG	CTG	GGC	TTT	ATG	CTT	TTC	TTT	CAA	CGG	TAC	GCG	1200
401	P	A	F	V	T	G	Y	N	I	N	S	F	D	L	K	Y	416
1201	CCG	GCC	TTT	GTG	ACC	GGT	TAC	AAC	ATC	AAC	TCT	TTT	GAC	TTG	AAG	TAC	1248
417	I	L	T	R	L	E	Y	L	Y	K	V	D	S	Q	R	F	432
1249	ATC	CTC	ACG	CGC	CTC	GAG	TAC	CTG	TAT	AAG	GTG	GAC	TCG	CAG	CGC	TTC	1296
433	C	K	L	P	T	A	Q	G	G	R	F	F	L	H	S	P	448
1297	TGC	AAG	TTG	CCT	ACG	GCG	CAG	GGC	GGC	CGT	TTC	TTT	TTA	CAC	AGC	CCC	1344
449	A	V	G	F	K	R	Q	Y	A	A	A	F	P	S	A	S	464
1345	GCC	GTG	GGT	TTT	AAG	CGG	CAG	TAC	GCC	GCC	GCC	TTT	CCC	TCG	GCT	TCT	1392
465	H	N	N	P	A	S	T	A	A	T	K	V	Y	I	A	G	480
1393	CAC	AAC	AAT	CCG	GCC	AGC	ACG	GCC	GCC	ACC	AAG	GTG	TAT	ATT	GCG	GGT	1440
481	S	V	V	I	D	M	Y	P	V	C	M	A	K	T	N	S	496
1441	TCG	GTG	GTT	ATC	GAC	ATG	TAC	CCC	GTA	TGC	ATG	GCC	AAG	ACT	AAC	TCG	1488
497	P	N	Y	K	L	N	T	M	A	E	L	Y	L	R	Q	R	512
1489	CCC	AAC	TAT	AAG	CTC	AAC	ACT	ATG	GCC	GAG	CTT	TAC	CTG	CGG	CAA	CGC	1536
513	K	D	D	L	S	Y	K	D	I	P	R	C	F	V	A	N	528
1537	AAG	GAT	GAC	CTG	TCC	TAC	AAG	GAC	ATC	CCG	CGT	TGT	TTC	GTG	GCT	AAT	1584
529	A	E	G	R	A	Q	V	G	R	Y	C	L	Q	D	A	V	544
1585	GCC	GAG	GGC	CGC	GCC	CAG	GTA	GGC	CGT	TAC	TGT	CTG	CAG	GAC	GCC	GTA	1632
545	L	V	R	D	L	F	N	T	I	N	F	H	Y	E	A	G	560
1633	TTG	GTG	CGC	GAT	CTG	TTC	AAC	ACC	ATT	AAT	TTT	CAC	TAC	GAG	GCC	GGG	1680
561	A	I	A	R	L	A	K	I	P	L	R	R	V	I	F	D	576
1681	GCC	ATC	GCG	CGG	CTG	GCT	AAA	ATT	CCG	TTG	CGG	CGT	GTC	ATC	TTT	GAC	1728
577	G	Q	Q	I	R	I	Y	T	S	L	L	D	E	C	A	C	592
1729	GGA	CAG	CAG	ATC	CGT	ATC	TAC	ACC	TCG	CTG	CTG	GAC	GAG	TGC	GCC	TGC	1776
593	R	D	F	I	L	P	N	H	Y	S	K	G	T	T	V	P	608
1777	CGC	GAT	TTT	ATC	CTG	CCC	AAC	CAC	TAC	AGC	AAA	GGT	ACG	ACG	GTG	CCC	1824
609	E	T	N	S	V	A	V	S	P	N	A	A	I	I	S	T	624
1825	GAA	ACG	AAT	AGT	GTT	GCC	GTG	TCA	CCT	AAC	GCC	GCT	ATC	ATC	TCT	ACC	1872

625	A	A	V	P	G	D	A	G	S	V	A	A	M	F	Q	M	640
1873	GCC	GCC	GTG	CCC	GGC	GAC	GCG	GGT	TCT	GTG	GCG	GCT	ATG	TTT	CAG	ATG	1920
641	S	P	P	L	Q	S	A	P	S	S	Q	D	G	V	L	P	656
1921	TCG	CCG	CCC	TTG	CAA	TCT	GCG	CCG	TCG	AGT	CAG	GAC	GGC	GTT	TTA	CCC	1968
641	G	S	G	S	N	S	S	S	S	V	G	V	F	S	V	G	672
1969	GGC	TCT	GGC	AGT	AAC	AGT	AGT	AGC	AGC	GTC	GGC	GTT	TTC	AGC	GTC	GGC	2016
673	S	G	S	S	G	G	V	G	V	S	N	D	S	H	G	A	688
2017	TCC	GGC	AGT	AGT	GGC	GGC	GTC	GGC	GTT	TCC	AAC	GAC	AGT	CAC	GGC	GCC	2064
689	G	G	T	A	A	V	S	Y	Q	G	A	T	V	F	E	P	704
2065	GGC	GGT	ACT	GCG	GCG	GTT	TCG	TAC	CAG	GGT	GCC	ACG	GTG	TTT	GAG	CCC	2112
705	E	V	G	Y	Y	N	D	P	V	A	V	F	D	F	A	S	720
2113	GAG	GTG	GGT	TAT	TAC	AAC	GAC	CCC	GTG	GCC	GTG	TTC	GAC	TTT	GCC	AGC	2160
721	L	Y	P	S	I	I	M	A	H	N	L	C	Y	S	T	L	736
2161	CTC	TAT	CCT	TCC	ATC	ATC	ATG	GCT	CAC	AAC	CTT	TGC	TAC	TCC	ACC	CTG	2208
737	L	V	P	G	G	E	Y	P	V	D	P	A	D	V	Y	S	752
2209	CTG	GTG	CCG	GGT	GGC	GAG	TAC	CCC	GTG	GAC	CCC	GCC	GAT	GTA	TAC	AGC	2256
753	V	T	L	E	N	G	V	T	H	R	F	V	R	A	S	V	768
2257	GTC	ACG	CTA	GAG	AAC	GGC	GTG	ACT	CAC	CGC	TTT	GTG	CGT	GCT	TCG	GTG	2304
769	R	V	S	V	L	S	E	L	L	N	K	W	V	S	Q	R	784
2305	CGC	GTC	TCG	GTG	CTT	TCG	GAA	CTG	CTC	AAC	AAG	TGG	GTT	TCG	CAG	CGC	2352
785	R	A	V	R	E	C	M	R	E	C	Q	D	P	V	R	R	800
2353	CGT	GCC	GTG	CGC	GAA	TGC	ATG	CGC	GAG	TGT	CAA	GAC	CCC	GTG	CGC	CGT	2400
801	M	L	L	D	K	E	Q	M	A	L	K	V	T	C	N	A	816
2401	ATG	CTG	CTC	GAC	AAG	GAA	CAG	ATG	GCA	CTC	AAA	GTA	ACG	TGC	AAC	GCT	2448
817	F	Y	G	F	T	G	V	V	N	G	M	M	P	C	L	P	832
2449	TTC	TAC	GGT	TTT	ACA	GGC	GTG	GTC	AAC	GGC	ATG	ATG	CCG	TGT	CTG	CCC	2496
833	I	A	A	S	I	T	R	I	G	R	D	M	L	E	R	T	848
2497	ATC	GCC	GCC	AGC	ATC	ACG	CGC	ATC	GGT	CGC	GAC	ATG	CTA	GAG	CGC	ACG	2544
849	A	R	F	I	K	D	N	F	S	E	P	C	F	L	H	N	864
2545	GCG	CGG	TTC	ATC	AAA	GAC	AAC	TTT	TCA	GAG	CCG	TGT	TTT	TTG	CAC	AAT	2592
865	F	F	N	Q	E	D	Y	V	V	G	T	R	E	G	D	S	880
2593	TTT	TTT	AAT	CAG	GAA	GAC	TAT	GTA	GTG	GGA	ACG	CGG	GAG	GGG	GAT	TCG	2640
881	E	E	S	S	T	L	P	E	G	L	E	T	S	S	G	G	896
2641	GAG	GAG	AGC	AGC	ACG	TTA	CCG	GAG	GGG	CTC	GAA	ACA	TCG	TCA	GGG	GGC	2688
897	S	D	E	R	R	V	E	A	R	V	I	Y	G	D	T	D	912
2689	TCG	GAC	GAA	CGG	CGG	GTG	GAG	GCG	CGG	GTC	ATC	TAC	GGG	GAC	ACG	GAC	2736
913	S	V	F	V	R	F	R	G	L	T	P	Q	A	L	V	A	928
2737	AGC	GTG	TTT	GTC	CGC	TTT	CGT	GGC	CTG	ACG	CCG	CAG	GCT	CTG	GTG	GCG	2784
929	R	G	P	S	L	A	H	Y	V	T	A	C	L	F	V	E	944
2785	CGT	GGG	CCC	AGC	CTG	GCG	CAC	TAC	GTG	ACG	GCC	TGT	CTT	TTT	GTG	GAG	2832
945	P	V	K	L	E	F	E	K	V	F	V	S	L	M	M	I	960
2833	CCC	GTC	AAG	CTG	GAG	TTT	GAA	AAG	GTC	TTC	GTC	TCT	CTT	ATG	ATG	ATC	2880

v715M GTG→ATG

←p2do

961	C	K	K	R	Y	I	G	K	V	E	G	A	S	G	L	S	976
2881	TGC	AAG	AAA	CGT	TAC	ATC	GGC	AAA	GTG	GAG	GGC	GCC	TCG	GGC	CTG	AGC	2928
977	M	K	G	V	D	L	V	R	K	T	A	C	E	F	V	K	992
2929	ATG	AAG	GGC	GTG	GAT	TTG	GTG	CGC	AAG	ACG	GCT	TGC	GAG	TTC	GTC	AAG	2976
993	G	V	T	R	D	V	L	S	L	L	G	E	D	R	E	V	1008
2977	GGC	GTC	ACG	CGT	GAC	GTC	CTC	TCG	CTG	CTC	TTT	GAG	GAT	CGC	GAG	GTC	3024
1009	S	E	A	A	V	R	L	S	R	L	S	L	D	E	V	K	1024
3025	TCG	GAA	GCA	GCC	GTG	CGC	CTG	TCG	CGC	CTC	TCA	CTC	GAT	GAA	GTC	AAG	3072
1025	K	Y	G	V	P	R	G	F	W	R	I	L	R	R	L	V	1040
3073	AAA	TAC	GGC	GTG	CCA	CGC	GGT	TTC	TGG	CGT	ATC	TTG	CGC	CGT	CTG	GTG	3120
1041	Q	A	R	D	D	L	Y	L	H	R	V	R	V	E	D	L	1056
3121	CAG	GCT	CGC	GAC	GAT	CTG	TAC	CTG	CAC	CGT	GTG	CGT	GTC	GAG	GAC	CTG	3168
1057	V	L	S	S	V	L	S	K	D	I	S	L	Y	R	Q	S	1072
3169	GTG	CTT	TCG	TCG	GTG	CTT	TCT	AAG	GAC	ATC	TCG	TTG	TAC	CGT	CAA	TCT	3216
1073	N	L	P	H	I	A	V	I	K	R	L	A	A	R	S	E	1088
3217	AAC	TTG	CCG	CAC	ATT	GCC	GTC	ATT	AAG	CGA	CTG	GCG	GCC	CGT	TCT	GAG	3264
1089	E	L	P	S	V	G	D	R	V	F	Y	V	L	T	A	P	1104
3265	GAG	CTA	CCC	TCG	GTC	GGG	GAT	CGG	GTC	TTT	TAC	GTC	CTG	ACG	GCG	CCC	3312
1105	G	V	R	T	A	P	Q	G	S	S	D	N	G	D	S	V	1120
3313	GGT	GTC	CGG	ACG	GCG	CCG	CAG	GGT	TCC	TCC	GAC	AAC	GGT	GAT	TCT	GTA	3360
1121	T	T	G	V	V	S	R	S	D	A	I	D	G	T	D	D	1136
3361	ACC	ACC	GGC	GTG	GTT	TCC	CGG	TCG	GAC	GCG	ATT	GAT	GGC	ACG	GAC	GAC	3408
1137	D	A	D	G	G	G	V	E	E	S	N	R	R	G	G	E	1152
3409	GAC	GCT	GAC	GGC	GGC	GGG	GTA	GAG	GAG	AGC	AAC	AGG	AGA	GGA	GGA	GAG	3456
1153	P	A	K	K	R	A	R	K	P	P	S	V	V	C	N	Y	1168
3457	CCG	GCA	AAG	AAG	AGG	GCG	CGG	AAA	CCA	CCG	TCG	GTC	GTG	TGC	AAC	TAC	3504
1169	E	V	A	E	D	P	S	Y	V	R	E	H	G	V	P	I	1184
3505	GAG	GTA	GCC	GAA	GAT	CCG	AGC	TAC	GTG	CGC	GAG	CAC	GGC	GTG	CCC	ATT	3552
1185	H	A	D	K	Y	F	E	Q	V	L	K	A	V	T	N	V	1200
3553	CAC	GCC	GAC	AAG	TAC	TTT	GAG	CAG	GTT	CTC	AAG	GCT	GTA	ACC	AAC	GTG	3600
1201	L	S	P	V	F	P	G	G	E	T	A	R	K	D	K	F	1216
3601	CTG	TCG	CCC	GTC	TTT	CCC	GGC	GGC	GAA	ACT	GCG	CGC	AAG	GAC	AAG	TTT	3648
1217	L	H	M	V	L	P	R	R	L	H	L	E	P	A	F	L	1232
3649	TTG	CAC	ATG	GTG	CTG	CCG	CGG	CGC	TTG	CAC	TTG	GAG	CCG	GCT	TTT	CTG	3696
1233	P	Y	S	V	K	A	H	E	C	C	*	1242					
3697	CCG	TAC	AGT	GTC	AAG	GCG	CAC	GAA	TGC	TGT	TG	3728					

## 7.2 Appendix 2

Die UL97-Sequenz des bakteriellen artifiziiellen Chromosoms TB40-BACKL7-UL32EGFP. Alle Punktmutationen, die in dieser Arbeit charakterisiert wurden, sind in violett markiert, alle Sequenzierungsprimer in grün.

1	M	S	S	A	R	L	S	R	A	R	S	A	S	L	G	T	16
1	ATG	TCC	TCC	GCA	CTT	CGG	TCT	CGG	GCT	CGC	TCG	GCC	TCG	CTC	GGA	ACG	48
17	T	T	Q	G	W	D	P	P	P	L	R	R	P	S	R	A	32
49	ACG	ACT	CAG	GGC	TGG	GAT	CCG	CCG	CCA	TTG	CGT	CGT	CCC	AGC	AGG	GCG	96
33	R	R	R	Q	W	M	R	E	A	A	Q	A	A	A	Q	A	48
97	CGC	CGG	CGC	CAG	TGG	ATG	CGC	GAA	GCT	GCG	CAG	GCC	GCC	GCT	CAA	GCC	144
49	A	V	Q	A	A	Q	A	A	A	A	Q	V	A	Q	A	H	64
145	GCG	GTA	CAG	GCC	GCG	CAG	GCC	GCC	GCC	GCT	CAA	GTT	GCC	CAG	GCT	CAC	192
65	V	D	E	D	E	V	V	D	L	M	A	D	E	A	G	G	80
193	GTC	GAT	GAA	GAC	GAG	GTC	GTG	GAT	CTG	ATG	GCC	GAC	GAG	GCC	GGC	GGC	240
81	G	V	T	T	L	T	T	L	S	S	V	S	T	T	T	V	96
241	GGC	GTC	ACC	ACT	TTG	ACC	ACC	CTG	AGT	TCC	GTC	AGC	ACA	ACC	ACC	GTG	288
97	L	G	H	A	T	F	S	A	C	V	R	S	D	V	M	R	112
289	CTT	GGA	CAC	GCG	ACT	TTT	TCC	GCA	TGC	GTT	CGA	AGT	GAC	GTG	ATG	CGT	336
113	D	G	E	K	E	D	A	A	S	D	K	E	N	Q	R	R	128
337	GAC	GGA	GAA	AAA	GAG	GAC	GCG	GCT	TCG	GAC	AAG	GAG	AAC	CAG	CGT	CGG	384
129	P	V	V	P	S	T	S	S	R	G	S	A	A	S	G	D	144
385	CCC	GTG	GTG	CCG	TCC	ACG	TCG	TCT	CGC	GGC	AGC	GCC	GCC	AGC	GGC	GAC	432
145	G	Y	H	G	L	R	C	R	E	T	S	A	M	W	S	F	160
433	GGT	TAC	CAC	GGC	TTG	CGC	TGC	CGC	GAA	ACC	TCG	GCC	ATG	TGG	TCG	TTC	480
161	E	Y	D	R	D	G	D	V	T	S	V	R	R	A	L	F	176
481	GAG	TAC	GAT	CGC	GAC	GGC	GAC	GTG	ACC	AGC	GTA	CGC	CGC	GCT	CTC	TTC	528
177	T	G	G	S	D	P	S	D	S	V	S	G	V	R	G	G	192
529	ACC	GGC	GGC	AGC	GAC	CCC	TCG	GAC	AGC	GTG	AGC	GGC	GTC	CGC	GGT	GGA	576
193	R	K	R	P	L	R	P	P	L	V	S	L	A	R	T	P	208
577	CGC	AAA	CGC	CCG	TTG	CGT	CCG	CCG	TTA	GTG	TCG	CTG	GCC	CGC	ACC	CCG	624
209	L	C	R	R	R	V	G	G	V	D	A	V	L	E	E	N	224
525	CTG	TGC	CGA	CGT	CGT	GTG	GGC	GGC	GTG	GAC	GCG	GTG	CTC	GAA	GAA	AAC	672
225	D	V	E	L	R	A	E	S	Q	D	S	A	V	A	S	G	240
673	GAC	GTG	GAG	CTG	CGC	GCG	GAA	AGT	CAG	GAC	AGC	GCC	GTG	GCA	TCG	GGC	720
241	P	G	R	V	P	Q	P	L	S	G	S	S	G	E	E	S	256
721	CCG	GGC	CGC	GTT	CCG	CAG	CCG	CTC	AGC	GGT	AGT	TCC	GGG	GAG	GAA	TCC	768
257	A	T	A	V	E	A	D	S	T	S	H	D	D	V	H	C	272
769	GCC	ACG	GCG	GTG	GAG	GCC	GAC	TCC	ACG	TCA	CAC	GAC	GAT	GTG	CAT	TGC	816
273	T	C	S	N	D	Q	I	I	T	T	S	I	R	G	L	T	288
817	ACC	TGT	TCC	AAC	GAC	CAG	ATC	ATC	ACC	ACG	TCC	ATC	CGC	GGC	CTT	ACG	864





## **Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift**

Die Arbeit wurde an dem Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten unter Betreuung von Prof. Dr. Dr. Klaus Hamprecht und Prof. Dr. Gerhard Jahn durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Dr. Katharina Göhring, Fachvirologin und AG-Leiterin bis September 2017.

Sämtliche Versuche wurden (nach Einarbeitung durch Dr. Trinh Weitbrecht) von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Dr. Trinh Weitbrecht durch mich.

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

Darmstadt, den 25.05.2021

Hannah Krümpelmann

## Danksagung

Ich möchte mich von Herzen bei allen bedanken, die mir geholfen haben, die vorliegende Arbeit zu vollenden.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Gerhard Jahn für die Aufnahme an das Institut, sowie Herrn Prof. Dr. Dr. Klaus Hamprecht für die Weiterbetreuung und die freundliche Unterstützung und Beratung während der Durchführung des Projektes. Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Trinh Weitbrecht für die hervorragende Betreuung während der Durchführung der Versuche bedanken. Ganz besonders danke ich auch Frau Dr. Katharina Göhring für die viele Zeit und Geduld, die sie während des Schreibens für mich aufbrachte. Danken möchte ich auch allen Mitarbeitern des Instituts für Virologie für die freundliche Aufnahme und ihre Hilfsbereitschaft. Ein großer Dank gilt auch meiner Familie und meinen Freunden, die mich jederzeit so großartig unterstützen.