

Aus dem Institut für medizinische Virologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin
in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch-Institut

DISSERTATION

Untersuchung der Variabilität eines Glykoproteins und eines
G-Protein-gekoppelten Rezeptors (UL55, UL33) von
Zytomegalie-Viren

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Merlin Deckers

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. D.H. Krüger
2. Priv.-Doz. Dr. med. W. Brune
3. Prof. Dr. Th. Stamminger

Datum der Promotion: 18.09.2009

I Inhaltsverzeichnis

I INHALTSVERZEICHNIS	III
II ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VI
1. EINLEITUNG	1
1.1 Herpesviren: Vorkommen und Einteilung	1
1.1.1 Herpesviren: Aufbau und Infektionszyklus.....	2
1.2 Zytomegalie-Viren.....	4
1.2.1 Zytomegalie-Viren: Verlauf der Infektion beim Menschen	4
1.2.2 Zytomegalie-Viren: Genom und Varianten.....	6
1.2.3 Intrazelluläre Veränderungen bei Zytomegalie-Virus-Infektion.....	8
1.2.4 Zytomegalie-Viren in Primaten.....	8
1.3 Glykoprotein B.....	9
1.3.1 Glykoproteine von HCMV	9
1.3.2 Glykoprotein B: Struktur und Funktionen	9
1.3.3 Glykoprotein B: Methodische Ansätze zur Erfassung genomischer Varianten	11
1.3.4 Studienlage der Arbeiten zu Genotypen der cleavage-site von Glykoprotein B	13
1.3.5 Rekombinationen von N-terminalen-, C-terminalen- und cls-Genotypen	14
1.4 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren.....	14
1.4.1 Vorkommen und Nomenklatur	14
1.4.2 Räumliche Struktur von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren.....	15
1.4.3 Signalweiterleitung über heterotrimere G-Proteine	16
1.4.4 Oligomerisierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren	17
1.5 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren in CMV	17
1.5.1 „Gen-pirating“ von Viren.....	17
1.5.2 Familien von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren in CMV	18
1.5.3 Auswirkungen viraler GPCR: UL33 aus Nager-CMV in knock-out-Versuchen	20
1.5.4 Exprimierung, Spleißen und Glykosylierung von Vertretern der UL33-Familie.....	20
1.5.5 Darstellung viraler GPCR in Zellen	21
1.5.6 Funktionelle Eigenschaften CMV-kodierter GPCR.....	22
1.5.7 Zellmigration und CMV-GPCR.....	23
Zielstellungen dieser Arbeit	24

2.	MATERIAL UND METHODEN	25
2.1	Material	25
2.1.1	Puffer und Lösungen	25
2.1.2	DNA-Längenstandards	25
2.1.3	Kits	25
2.1.4	Geräte	26
2.1.5	Software	26
2.1.6	PCR-Primer	27
2.1.7	Locked-nucleic-acid Oligonukleotide	28
2.1.8	Biologisches Material	28
2.2	Methoden.....	30
2.2.1	DNA-Extraktion aus Gewebematerial und Lagerung	30
2.2.2	Konzentrationsbestimmungen	31
2.2.3	Polymerase-Kettenreaktion	31
2.2.4	Nested-PCR.....	32
2.2.5	Thermocycling mit degenerierten Primern zur Detektion unbekannter Sequenzvarianten	34
2.2.6	Antisense locked-nucleic-acid Oligonukleotide für PCR.....	35
2.2.7	Agarose-Gelelektrophorese	38
2.2.8	Aufreinigung von PCR-Produkten	38
2.2.9	Kopienzahlberechnung	39
2.2.10	Sequenzierung	39
2.2.11	Bearbeitung der Sequenz-Rohdaten	40
2.2.12	Phylogenetische Analyse.....	40
3.	ERGEBNISSE	42
3.1	Polymerase-Kettenreaktion	42
3.1.1	Primergenerierung	42
3.1.2	Degenerierte Primer für das gB-Gen	43
3.1.3	Degenerierte Primer für das UL33-Gen	45
3.1.4	Optimierung des Thermocyclings	46
3.1.5	Matrizengenerierung und PCR-Sensitivität.....	47
3.1.6	Sensitivität der nested-PCR für das gB-Gen	48
3.1.7	Sensitivität der nested-PCR für das UL33-Gen	48
3.2	Antisense locked-nucleic-acid Oligonukleotide in PCR	49
3.2.1	Design der LNA	49
3.2.2	Auswirkungen der LNA auf die Amplifikation von gB-Genotypen in der PCR	51
3.2.3	Auswirkungen der LNA auf die Amplifikation mehrerer gB-Matrizen in einzelnen PCR	55

3.3	Untersuchung von Humanproben mittels PCR und LNA	56
3.3.1	Detektion und Zuordnung von gB-Genotypen	56
3.3.2	Detektion eines unbekanntes UL33-Genotyps.....	57
3.3.3	Detektion und Zuordnung von UL33-Genotypen	58
3.3.4	UL33-Sequenzvergleich und Berechnungen zur UL33-Proteinstruktur	59
3.3.5	Detektierte Genotypen der Untersuchung von Humanproben	63
3.3.6	Genetische Kopplung von gB und UL33	66
3.4	Ergebnisse der PCR-Testung an Tierproben	66
4.	DISKUSSION	68
4.1	PCR-Systeme für gB (UL55) und UL33	68
4.1.1	PCR-Sensibilität und Untersuchung von CMV nicht-humaner Primaten	69
4.2	Selektive PCR-Ampifikation von HCMV-Genotypen durch LNA	70
4.3	Genotypisierung von Humanproben.....	72
4.3.1	Glykoprotein B.....	72
4.3.2	UL33	76
4.3.3	Genetische Kopplung von gB und UL33 und homologe Rekombination innerhalb von HCMV	78
4.4	Abschließende Bemerkungen und Ausblick	79
5.	ZUSAMMENFASSUNG	81
6.	LITERATURVERZEICHNIS	83
ANHANG	93

II Abkürzungsverzeichnis

Molekularbiologische Begriffe und Abkürzungen

7-TM	Sieben-Transmembran-Rezeptor
⊗	Basenfehlpaarung
A	Adenin
Acc.-no.	accession number, engl. für Zugriffsnummer für die GenBank
AIDS	acquired immune deficiency syndrome, engl. für erworbenes Immundefektsyndrom
alignment	Darstellung eines Sequenzabgleichs (engl.)
as	antisense
B	Cytosin, Guanin oder Thymin
Blast	Basic Local Alignment Search Tool
C	Cytosin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCL	Chemokin (mit C-C Motiv)
CCMV	Schimpansen-Zytomegalie-Virus
cls	cleavage site, engl. für Spaltstelle
CMV	Zytomegalie-Virus
CRE	cAMP response element
CREB	cAMP response element-binding protein
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
CX3CL1	Chemokin (mit C-X3-C Motiv) Ligand 1
ddNTP	2'- 3'-Dideoxyribonukleosidtriphosphate
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Nukleotide
EBV	Epstein-Barr-Virus
G	Guanin
gB	Glykoprotein B
gCI	Glykoprotein-Komplex I
gCII	Glykoprotein-Komplex II

gCIII	Glykoprotein-Komplex III
GDP	Guanosindiphosphat
GenBank	Gendatenbank: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/
Ggor	Gorilla gorilla
gH	Glykoprotein H
gL	Glykoprotein L
gM	Glykoprotein M
gN	Glykoprotein N
gO	Glykoprotein O
GPCR	G-protein-coupled receptor, engl. für G-Protein-gekoppelte Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
HCMV	Humanes Zytomegalie-Virus
HHV-6	humanes Herpesvirus 6
HHV-7	humanes Herpesvirus 7
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HSV	Herpes-simplex-Virus
i	Inosin
IP ₃	Inositoltriphosphat
IR _L	internal repeat left (engl.)
IR _S	internal repeat right (engl.)
KSHV	Kaposi-Sarkom-assoziiertes Herpesvirus
LNA	locked-nucleic-acid Oligonukleotid
M33	Maus-Zytomegalievirus-Analogen von UL33
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
MCMV	Maus-Zytomegalie-Virus
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure (engl.)
N	Adenin, Cytosin, Guanin oder Thymin
nested	verschachtelt (engl.)
NH ₂	Aminogruppe
ORF	open reading frame, engl. für offener Leserahmen
PCR	polymerase chain reaction, engl. für Polymerase-Kettenreaktion
Ptro	Pan troglodytes, Schimpansen
R	Adenin oder Guanin

R33	Ratten-Zytomegalie-Virus-Analogon von UL33
ramp-time	Zeit zwischen Annealing- und Elongationsschritt einer PCR (engl.)
RANTES	regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
RCMV	Ratten-Zytomegalie-Virus
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
s	sense
T	Thymin
TR _L	terminal repeat left (engl.)
TR _S	terminal repeat right (engl.)
U _L	unique region left (engl.)
U _S	unique region right (engl.)
VZV	Varicella-Zoster-Virus
Y	Cytosin oder Thymin

Technische Einheiten und Messgrößen

ad.	auffüllen bis
°C	Grad Celsius
min	Minute
ml	Milliliter
nm	Nanometer
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
sec	Sekunde
$\Delta_{\text{md}} T_m$	mismatch-Diskriminierungs-Schmelztemperaturdifferenz
M	Molar
Ka	nichtsynonyme Divergenz
kBp	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Bp	Basenpaare
T _m	Schmelztemperatur

1. Einleitung

1.1 Herpesviren: Vorkommen und Einteilung

Herpesviren sind weit verbreitet. So konnten Herpesviren unter anderem in Säugetieren, Vögeln, Reptilien und Fischen nachgewiesen werden. Insgesamt wurden bisher über 200 verschiedene Herpesviren detektiert, davon ca. 100 in Primaten. Acht herpesvirale Spezies konnten im Menschen nachgewiesen werden: das Herpes-simplex-Virus (HSV-1 und -2), das Varicella-Zoster-Virus (VZV), das Epstein-Barr-Virus (EBV), das Zytomegalie-Virus (HCMV), das humane Herpesvirus 6 (HHV-6A und HHV-6B), das humane Herpesvirus 7 (HHV-7), sowie das Kaposi-Sarkom-assoziierte Herpesvirus (KSHV) (siehe Tab. 1.1).

Herpesviren gehören einer der größten bekannten Virusfamilien an und stellen bei Mensch und Tier bedeutende Krankheitserreger dar. Allen bekannten Vertretern der Familie der Herpesviren sind vier verschiedene Merkmale gemeinsam: i) sie kodieren für verschiedene Enzyme, um DNA- und Proteinsynthese zu bewerkstelligen; ii) die Synthese der viralen DNA sowie der Zusammenbau des Kapsids erfolgen im Zellkern; iii) zur Freisetzung infektiöser Partikel ist eine Zelllyse erforderlich; iv) Herpesviren können Wirtszellen latent infizieren, aus dem Stadium der Latenz wieder reaktiviert werden und verschiedene Erkrankungen verursachen (Pellett *et al.*, 2006).

Unterfamilie	Genus	Spezies
α -Herpesvirinae	Simplexvirus	Herpes-simplex-Virus Typ 1 (HHV-1) Herpes-simplex-Virus Typ 2 (HHV-2)
	Varicellovirus	Varicella-Zoster-Virus (HHV-3)
β -Herpesvirinae	Zytomegalievirus	Zytomegalie-Virus (HHV-5)
	Roseolovirus	HHV6 HHV7
γ -Herpesvirinae	Lymphocryptovirus	Epstein-Barr-Virus (HHV-4)
	Rhadinovirus	Kaposi-Sarkom-assoziierte Herpesvirus (HHV-8)

Tabelle 1.1: Übersicht über die Familie der Herpesviridae des Menschen

Einleitung

Herpesviren werden in drei Unterfamilien eingeteilt, die α -, β -, und γ -Herpesvirinae (Tabelle 1.1). α -Herpesvirinae zeichnen sich durch ihren kurzen Replikationszyklus, den schnell eintretenden zytopathischen Effekt und das Vermögen vor allem in sensorischen Ganglien latent zu persistieren, aus. Zwei Genera der α -Herpesvirinae enthalten die menschlichen Herpesviridae: HSV-1 und HSV-2 sowie VZV. Simplex- und Varicelloviren verursachen Infektionen von Haut und Schleimhaut und persistieren in Ganglienzellen. Es zeigen sich entzündliche Bläschen, bei HSV vor allem im Oral- und Genitalbereich, beim VZV in Form der segmental verlaufenden Eruptionen im Ausbreitungsgebiet eines sensorischen Spinalnerven. β -Herpesvirinae zeigen einen langen Replikationszyklus und Zytomegalie als eine typische histopathologische Veränderung. Sie persistieren latent in Speicheldrüsen, lymphoretikulären Zellen, Nieren- und anderem Gewebe. Zwei Genera der β -Herpesvirinae sind beim Menschen bekannt: das Genus HCMV und das der Roseoloviren, mit HHV-6A, HHV-6B und HHV-7. Primärinfektionen mit Zytomegalie-Viren sind meist asymptomatisch, wobei eine Reaktivierung in immunsupprimierten Wirten schwerwiegende Organmanifestationen verursachen kann. Infektionen mit Roseoloviren sind benigne, zeigen charakteristische kutane Effloreszenzen bei Kindern und können durch leichtes Fieber begleitet werden. γ -Herpesvirinae sind charakterisiert durch einen langen Replikationszyklus sowie Replikation und Latenz in lymphoblastoiden Zellen. Innerhalb der γ -Herpesvirinae wurden für den Menschen zwei Genera beschrieben: das Lymphocryptovirus und das Rhadinovirus. Der humane Vertreter der Lymphocryptoviren ist das Epstein-Barr-Virus. Die Primärinfektion mit EBV verläuft meist asymptomatisch, kann jedoch auch als so genannte „infektiöse Mononukleose“ klinisch auffällig werden. EBV kann die Entwicklung eines Burkitt-Lymphoms verursachen, eine Rolle in der Pathogenese von Nasopharynx-Karzinomen und Hodgkin-Lymphomen wird diskutiert. Der humane Vertreter des Genus Rhadinovirus ist das Kaposi-Sarkom-assoziierte Herpesvirus. Es scheint an der Pathogenese des Kaposi-Sarkoms, wie es bei AIDS-Patienten auftritt, maßgeblich beteiligt zu sein (Chang *et al.*, 1994).

1.1.1 Herpesviren: Aufbau und Infektionszyklus

Herpesvirionen sind umhüllte DNA-Viren mit einem Durchmesser von 120-260 nm. Das lineare doppelsträngige Genom formt einen Torus, welcher assoziiert mit Proteinen als sogenanntes Core vorliegt. Das Core ist von einem Kapsid umschlossen. Dieses zeigt eine ikosaedrische Form und ist ein Komplex aus 162 Kapsomeren und für alle Herpesviren charakteristisch. Zwischen Kapsid und herpesviraler Hülle liegt das Tegument, welches elektronenmikroskopisch

Einleitung

als unstrukturierter, fibröser Bereich anmutet und funktionell wichtige Proteine des Virus enthalten kann. Die herpesvirale Hüllmembran erhält das Virion von der Wirtszelle durch Ausknospung. Verschiedene viral kodierte Glykoproteine und Polypeptide sind in diese eingelagert. Abbildung 1.1 zeigt schematisch die Herpesvirion-Morphologie.

Der Ablauf einer herpesviralen Infektion kann allgemein dargestellt werden, wobei die Infektionszyklen bei verschiedenen Vertretern der Herpesviridae variieren. Der Bindung des Virus an die Zelloberfläche der Wirtszelle (attachment) folgt die Fusion von Virus- und Zellmembran (penetration). Die virale DNA wird im Kapsid zum Zellkern transportiert, wo sie durch die Kernporen in den Zellkern gelangt und dort zirkularisiert.

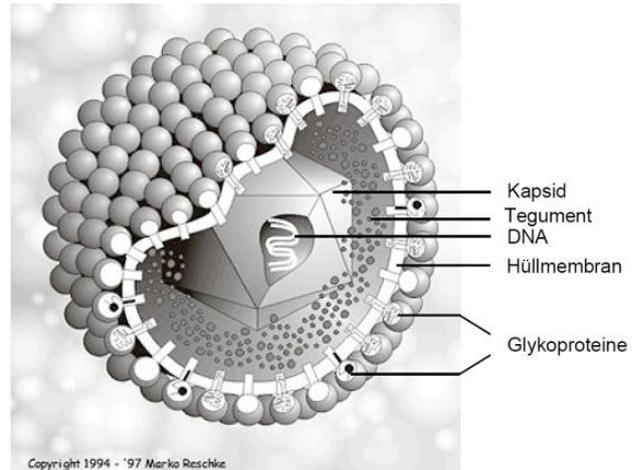


Abbildung 1.1: Schema eines Herpesvirions
(aus: The Big Picture Book of Viruses, accessed 01.11.2007 at <http://www.virology.net>)

Es folgt eine Transkription und Replikation

der viralen DNA. Die Genexpression erfolgt als eine geordnete Kaskade, wobei man immediate early-, early- und late-Genexpression unterscheidet. Die Expressionskaskade wird durch die Aktivierung der immediate early-Gene durch zelluläre Transaktivatoren gestartet. Nachfolgend wird durch die immediate early-Proteine die Expression der early-Gene reguliert. Die early-Proteine sind hauptsächlich für die virale DNA-Replikation benötigte Enzyme, wie z.B. die DNA-Polymerase. Die late-Gene kodieren für virale Strukturproteine sowie Proteine, welche an der Prozessierung, Verpackung und Reifung der Viruspartikel beteiligt sind.

Der Zusammenbau (assembly) des Virions erfolgt im Nukleus, wobei in neu synthetisierte und assemblierte Kapside die Virus-DNA eingefüllt wird. Die Virus-DNA wird im Kapsid geschnitten, erste Tegumentproteine werden an das Kapsid angelagert. Ausschleusung in das Zytoplasma der Wirtszelle und Interaktionen mit Zellorganellen wie dem endoplasmatischen Retikulum verleihen dem Virus weitere Tegumentproteine, Hülle und Hüllproteine. Ein weiteres Ausknospen (budding) des Virions kann neben der Kernmembran auch an der Zellmembran erfolgen, wobei dann umhüllte, reife Virionen freigesetzt werden.

Herpesviren replizieren lytisch, wobei die Wirtszelle desintegriert und so die infektiösen Virionen freigegeben werden. Alternativ kann eine langfristige Etablierung des Virus im Wirt erfolgen. Bei dieser latenten Infektion durch ein Herpesvirus liegt die virale DNA als zirkuläres, episomales DNA-Molekül im Zellkern der infizierten Zellen vor. Diese lebenslang

persistierenden Viren können jedoch bei entsprechenden Umständen (z.B. Immunsuppression) reaktivieren und wieder in den lytischen Zyklus eintreten.

1.2 Zytomegalie-Viren

1.2.1 Zytomegalie-Viren: Verlauf der Infektion beim Menschen

Die HCMV-Infektion beim Menschen stellt die häufigste prä- und perinatale Virusinfektion des Kindes dar. Die Erforschung der HCMV-Infektion des Menschen lässt sich bis in das beginnende 20. Jahrhundert an deutschen Instituten zurückverfolgen. 1904 beschrieb Jesionek Einschlusskörper in Organen eines frühgeborenen Fetus, von dem er vermutete, dass er an Syphilis verstorben sei (Diosi, 1997). Im Jahre 1921 wurde der Terminus „Zytomegalie“ für dieses Erkrankungsbild erstmals verwendet. 1926 fanden erste Infektionsversuche mit Meerschweinchen statt. In den 1950er Jahren konnten dann sowohl das Viruspartikel elektronenmikroskopisch dargestellt werden als auch erste Kulturen von murinem und humanem HCMV isoliert werden (Mocarski *et al.*, 2006).

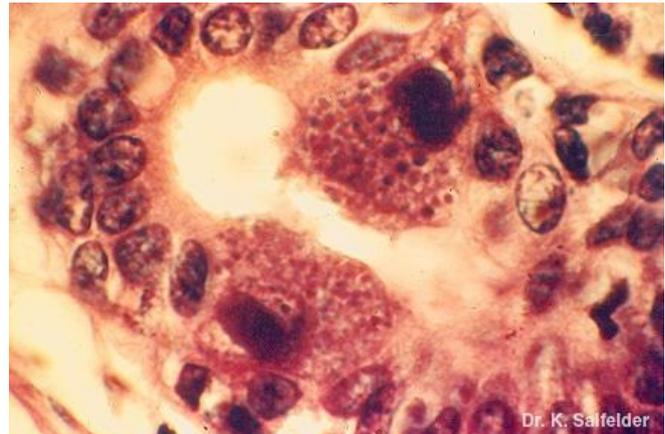


Abbildung 1.2: Zytomegalie: Einschlusskörperchen in Nierentubuluszellen bei HCMV-Infektion. Die Vergrößerung der infizierten Zellen erfolgt durch mit Virionen gefüllte zytoplasmatische Einschlüsse (Bild von Dr. K. Salfelder, Universidad de los Andes, accessed 05.01.2008 at <http://www.saber.ula.ve>).

Die HCMV-Infektion kommt weltweit in allen ethnischen Gruppen und Altersstufen vor. Die Seroprävalenz von HCMV-Antikörpern liegt je nach Entwicklungszustand des Landes zwischen 60% und 100% bei Erwachsenen. Die Infektion erfolgt meist in der Kindheit bis zu einem Alter von drei Jahren. Nachfolgend persistiert HCMV latent in Körperzellen (Mocarski *et al.*, 2006). Übertragen wird HCMV über Körperflüssigkeiten, infektiöses Virus konnte unter anderem in Blut, Speichel, Urin, Tränenflüssigkeit, Samenflüssigkeit und cervicovaginalem Sekret nachgewiesen werden. Eine Infektion erfolgt vor allem durch den Umgang mit Kindern und durch sexuelle Kontakte (Mocarski *et al.*, 2006). HCMV ist die häufigste prä- und perinatale Virusinfektion des Menschen, ca. 1% aller Neugeborenen werden kongenital mit HCMV infiziert. Die konnatale Infektion erfolgt bei 0,1% bis 0,5% aller Neugeborenen und verläuft

Einleitung

meist asymptomatisch, nur in 5% bis 15% der Fälle liegt eine symptomatische HCMV-Infektion vor. Die Infektion des Feten erfolgt in weit überwiegenderem Maße durch eine Primärinfektion der Mutter.

90% der kongenital infizierten Neugeborenen sind asymptomatisch infiziert, jedoch erleiden insgesamt 15% im weiteren Verlauf einen meist einseitigen Hörverlust. Die Symptomatik einer

pränatalen Infektion ist variabel und umfasst: Mangelgeburt, Hepatosplenomegalie, Ikterus und Pneumonie. Neurologische Beteiligung ist häufig mit Mikroencephalie, Hydrocephalus, Encephalitis, mentaler Retardierung, Krampfleiden und Labyrinthitis mit progredientem Hörverlust verbunden (Demmler *et al.*, 2003). Peri- und postnatale Infektionen zeigen eine mononukleoseähnliche Symptomatik mit Fieber, Pneumonie, Hepatitis und Retinitis. Hierbei erfolgt die Übertragung perinatal über Körperflüssigkeiten der Mutter und postnatal vor allem über die Muttermilch. Risikofaktor für das Neugeborene ist vor allem eine Frühgeburt. Hamprecht *et al.* konnten zeigen, dass bei 96% seropositiver stillender Mütter eine Reaktivierung von HCMV stattfand. 37% der frühgeborenen Säuglinge wurden infiziert und ca. die Hälfte erlitt eine symptomatische Infektion (Hamprecht *et al.*, 2001).

HCMV-Infektionen von immunkompetenten Kindern und Erwachsenen zeigen einen benignen Verlauf und bei ca. 10% der Betroffenen eine milde, grippeähnliche Symptomatik. In immunsupprimierten Kindern und Erwachsenen kann eine Primärinfektion oder eine endogene Reaktivierung jedoch eine schwerwiegende Symptomatik mit stark erhöhter Mortalität zur Folge haben. Durch das HI-Virus immunsupprimierte Patienten erleiden häufig eine HCMV-abhängige Retinitis, Kolitis und Encephalitis. Nierentransplantierte Patienten zeigen HCMV-bedingt einen Transplantatverlust, Lebertransplantat-Empfänger vor allem Hepatitis und Kolitis, knochenmark- und lungentransplantierte Patienten vor allem Pneumonie, Herztransplantat-Empfänger eine initiale Myokarditis mit einer nachfolgend erhöhten Arteriosklerose.

Seroepidemiologische Untersuchungen und Tierversuche weisen auf eine Beteiligung von HCMV an verschiedenen vaskulären Erkrankungen hin. Dazu zählen Autoimmun-Vaskulitiden, Arteriosklerose sowie eine Restenosis nach Gefäßoperationen. Bei Herztransplantationen konnte eine erhöhte chronische Abstoßung und eine Sklerose der Transplantatgefäße nachgewiesen werden (Übersichtsarbeit von Stassen *et al.*, 2006).



Abbildung 1.3: HCMV-Retinitis. HCMV verursacht eine schwere, progressive Entzündung der Netzhaut, die unbehandelt zur Erblindung führt (aus Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, 260 Auflage).

Einleitung

Zur Behandlung von schwerwiegenden HCMV-Symptomen stehen verschiedene Virostatika zur Verfügung. Ganciclovir ist ein Guanin-Nukleosid-Analogon, welches in infizierten Zellen durch viruskodierte Kinasen phosphoryliert werden kann und nachfolgend bei Einbau in den neu synthetisierten DNA-Strang zu einem Kettenabbruch führt. Ganciclovir ist derzeit das wirkungsvollste Virostatikum für die Behandlung von HCMV und kann auch bei Kindern und Neugeborenen eingesetzt werden. Eine Nebenwirkung ist vor allem eine dosisabhängige, reversible Knochenmarksdepression, welche ein exaktes Blutbild-Monitoring unter Ganciclovir erfordert. Zur Therapieresistenz kommt es häufiger durch Resistenzmutanten gegen Ganciclovir. Alternativ können andere Nukleosidanaloga eingesetzt werden, wie beispielsweise Cidofovir oder DNA-Polymerase-Hemmstoffe wie Foscarnet. Eine passive Impfung durch intravenöse Gabe von HCMV-Immunglobulin steht für Immunsupprimierte nach erfolgter HCMV-Exposition zur Verfügung. Eine wirkungsvolle aktive Impfung gegen HCMV konnte bisher nicht etabliert werden, verschiedene experimentelle Impfungen sind in präklinischer und klinischer Untersuchung (Schleiss, 2005).

HIV-positive Patienten leiden häufig unter HCMV-verursachten Pathologien. Seit Einführung der hoch aktiven antiretroviralen Therapie (HAART) in den westlichen Industrieländern konnte hier die Therapie von AIDS-Patienten stark verbessert werden. Überraschenderweise zeigte der Nachweis von HCMV im Blut eine signifikante Assoziation mit einem schlechteren Verlauf der HIV-Erkrankung, unabhängig von CD4-Zellzahl und HIV-RNA-Menge im Blut (Deayton *et al.*, 2004). Somit scheint es eine synergistische HCMV-HIV-Wechselwirkung zu geben.

1.2.2 Zytomegalie-Viren: Genom und Varianten

HCMV hat das größte Genom aller acht humanen Herpesviren, insgesamt 236 Kbp linearer, doppelsträngiger DNA. Das Genom ist aus zwei kovalent verbundenen (L und S) Segmenten aufgebaut. Jedes Segment beinhaltet eine „unique region“ (U_L und U_S) sowie ein „terminal repeat“ (TR_L und TR_S) und ein „internal repeat“ (IR_L und IR_S). Die Konfiguration des HCMV-Genoms kann allgemein als: $TR_L-U_L-IR_L-IR_S-U_S-TR_S$ dargestellt werden (Pellett *et al.*, 2006). HCMV kodiert nach bisherigen Erkenntnissen über 166 Gene, verschiedene *in silico* Untersuchungen zeigten bis zu 252 mögliche offene Leseraster (ORF, engl. open reading frame) (Mocarski *et al.*, 2006; Murphy *et al.*, 2003). Eine systematische, funktionelle Untersuchung von 162 Genen von HCMV zeigte, dass nur 45 Gene für das Wachstum von HCMV in Zellkultur essentiell sind (Dunn *et al.*, 2003).

HCMV wird routinemäßig auf humanen fetalen Fibroblastenzelllinien passagiert, Laborstämme

Einleitung

wie AD169 und Towne seit vielen Jahrzehnten (AD169 seit 1956, Towne seit 1975). AD169 weist frameshift-Mutationen in drei Genen auf, 19 Gene des rechten Endes von U_L werden nicht mehr kodiert und abhängig vom Ursprung des AD169-Stamms sind weitere Gene verändert oder deletiert. Auch andere Laborstämme können nicht mehr als identisch zu Wildtyp-HCMV betrachtet werden. Als Prototyp-Stamm für Wildtyp-HCMV wird in dieser Arbeit auf den Stamm Merlin (accession number: AY44689) bezuggenommen (Dolan *et al.*, 2004).

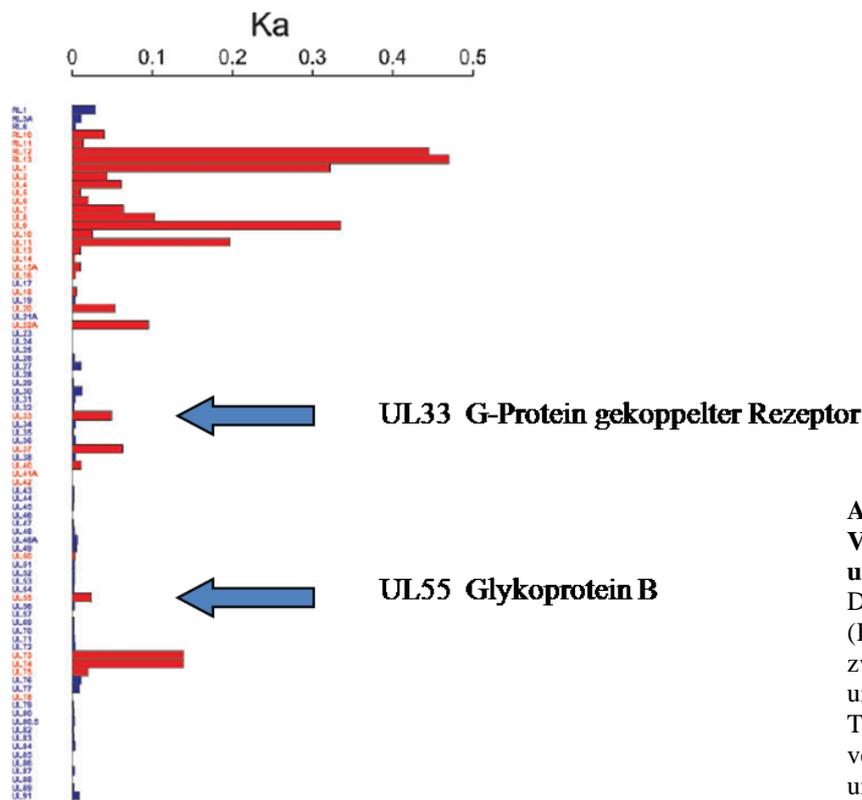


Abbildung 1.4: Darstellung der Variabilität der Gene der unique left Region von HCMV. Die nichtsynonyme Divergenz (Ka) wurde aus Vergleichen zwischen den Stämmen Merlin und AD169 beziehungsweise Toledo berechnet. Die Pfeile verweisen auf die Gene UL33 und UL55. Aus Dolan *et al.* (2004).

Die Sequenzen der bisher komplett sequenzierten HCMV-Stämme weisen in bestimmten Genen Unterschiede auf. Diese variablen Gene wurden durch Vergleiche zwischen dem Stamm Merlin und AD169 beziehungsweise Toledo in Abbildung 1.4 graphisch dargestellt. Hochvariable Genbereiche entsprechen beispielsweise der TR_L -Region und einzelnen Genen der U_L -Region (höhere nichtsynonyme Divergenz [Ka] und längere Balken in Abbildung 1.4). Zwei Gene wurden in der vorliegenden Arbeit auf ihre Variabilität untersucht, UL33, kodierend für einen G-Protein-gekoppelter Rezeptor, und UL55, kodierend für Glykoprotein B (Pfeile in Abbildung 1.4).

Mit verschiedenen methodischen Ansätzen wurde die Variabilität von HCMV bisher untersucht: Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus-Analyse des gesamten Genoms, Amplifikation von Genomabschnitten oder Genen mit nachfolgendem Restriktionsverdau, Southern Blot oder

Sequenzierung. So wurde die Variabilität der α -Sequenz, von UL144, UL146, Glykoprotein N (UL73), Glykoprotein O (UL74) und Glykoprotein B (UL55) mehrfach untersucht. Die Fragestellung der Arbeiten basierte meist auf der Vermutung, dass typische Sequenzmuster in diesen variablen Genen vorkommen müssen, die die jeweiligen Genotypen mit unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften ausstatten. Somit könnten einzelne Genotypen verschiedenen epidemiologischen Zusammenhängen zugeordnet werden, wie Krankheitsverlauf, Organtropismus etc. Jedoch zeigten sich geringe oder fehlende signifikante Zusammenhänge zu epidemiologischen Zuordnungen. Zu zunächst als signifikant beurteilten Zusammenhängen zeigten nachfolgende Studien oft widersprüchliche Ergebnisse (Übersichtsarbeit von Pignatelli *et al.* 2004).

1.2.3 Intrazelluläre Veränderungen bei Zytomegalie-Virus-Infektion

Generell kann bei der HCMV-Infektion eine Veränderung des intrazellulären Milieus beobachtet werden. Hierbei können zwei Phasen voneinander abgegrenzt werden: ein initialer Höchstwert zellulärer Signalaktivität, der durch Kontakt viraler Glykoproteine mit zellulären Rezeptoren auf der Zelloberfläche verursacht wird. Dabei zeigen sich gesteigerte Aktivitäten verschiedener Zell-Signalwege wie z.B. Kalziumkonzentrationsveränderungen, Inositolphosphat-Hydrolyse, Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie dem nukleären Faktor κ B und Induktion von Zytokinen wie z.B. Interferon und von Prostaglandinen. In einer zweiten Phase nach Abfall des initialen Aktivitäts-Höchstwertes kann 4 bis 12 Stunden nach Infektion ein erneuter, anhaltender, allmählicher Anstieg zellulärer Stress- und Signaltransmitter beobachtet werden. Dieser beginnt zeitlich synchron mit der Translation viraler immediate-early-Proteine (Übersichtsarbeit von Compton, 2004).

1.2.4 Zytomegalie-Viren in Primaten

Nach bisherigen Erkenntnissen sind Zytomegalie-Viren überwiegend wirtsspezifisch. Artspezifische Zytomegalie-Viren konnten für Primaten, aber beispielsweise auch für Ratten, Mäuse und Meerschweinchen nachgewiesen werden. Hinweise auf eine nur eingeschränkte Wirtsspezifität ergeben sich aus Zellkulturversuchen, wo beispielsweise Schimpansen-CMV auf humanen embryonalen Lungenzellen repliziert oder HCMV auf Schimpansen-Fibroblasten (Swinkels *et al.*, 1984; Perot *et al.*, 1992). Auch konnte ein CMV-Stamm (Colburn-Stamm) bei einem Patienten mit Encephalitis isoliert werden, der größte Ähnlichkeit zu Altweltaffen-CMV zeigt (Huang *et al.*, 1978; Leendertz *et al.*, eingereicht).

Primaten-CMV konnte von der Arbeitsgruppe Ehlers *et al.* unter anderem in verschiedenen Neu- und Altweltaffen, Orang-Utans, Gorillas und Schimpansen nachgewiesen werden. Hierbei konnten einige bisher unbekannte CMV detektiert werden. Phylogenetische Analysen dieser CMV-Sequenzen zeigten, dass sowohl in Schimpansen als auch in Gorillas jeweils zwei hochdivergente Stämme von CMV nachzuweisen sind (Leendertz *et al.*, eingereicht). Somit besteht die Möglichkeit, dass auch im Menschen, ob koevolutionär bedingt oder durch Übertragung von anderen nicht-humanen Primaten, bisher unbekannte hochdivergente HCMV vorkommen.

1.3 Glykoprotein B

1.3.1 Glykoproteine von HCMV

Die Hülle des HCMV-Virions enthält eine Vielzahl von viruskodierten Glykoproteinen. Sequenzanalysen zufolge weisen über 50 viruskodierte Proteine entweder Glykosylierungsstellen oder mutmaßliche Transmembranregionen auf. Drei Komplexe von Hüllglykoproteinen spielen eine funktionell kritische Rolle: Glykoprotein-Komplex I (gCI), Glykoprotein-Komplex II (gCII) und Glykoprotein-Komplex III (gCIII).

Der gCI wird aus gB (UL55) aufgebaut; gCII enthält Glykoprotein M (gM, UL100) und Glykoprotein N (gN, UL73). Beide Komplexe scheinen mit Heparansulfaten zu interagieren (Mocarski *et al.*, 2006). gCIII enthält Glykoprotein O (gO, UL74) und Glykoprotein H (gH, UL75), kann jedoch in größeren Heteropolymeren vorkommen und beispielsweise auch Glykoprotein L (gL, UL115) enthalten. gCIII scheint eine Rolle bei der Zellfusion zu spielen (Mocarski *et al.*, 2006). gN und gO zeigen jeweils vier distinkte Genotypen und auf Aminosäureebene eine Variabilität von ca. 50%. gB weist fünf distinkte Genotypen auf und eine Variabilität von ca. 10 bis 15% auf Aminosäureebene. gH zeigt N-terminal zwei unterschiedliche Genotypen, gL zeigt vier Genotypen und gH und gL eine Varianz der Aminosäurenabfolge um 5% (Pignatelli *et al.*, 2004; Rasmussen *et al.*, 2003). Bis auf gO sind alle genannten Glykoproteine essentiell für die Replikation von HCMV *in vitro* (Dunn *et al.*, 2003).

1.3.2 Glykoprotein B: Struktur und Funktionen

Das Glykoprotein-B (gB) Gen UL55 befindet sich im Genom von Wildtyp-HCMV (Stamm Merlin) an Position 150857 : 153580 (Insgesamt 2721 Bp / 906 Aminosäuren) in der U_L (Dolan *et al.*, 2004). UL55 ist für die HCMV-Replikation essentiell (Dunn *et al.*, 2003). gB wird als ein

Einleitung

169 kDa großes Polyprotein exprimiert. Nachfolgend wird gB an der „cleavage site“ (cls, dt. Schnittstelle) durch eine zelluläre Furin-Endoproteinase an den Aminosäuren 460/461 nach der Abfolge Arg-Thr-Arg-Arg geschnitten (bei 1380/81 Bp) (Strive *et al.*, 2002). Das 116 kD umfassende Oberflächenprotein wird dann über Disulfidbrücken mit dem 55 kD großen Transmembranprotein kovalent verbunden (Abb. 1.5).

gB ist neben gM wichtig für die Interaktion von Virushülle mit zellulären Heparansulfaten sowie für die nachfolgenden Schritte der Virionenbindung an die Wirtszelle und des Eintritts in die Wirtszelle. Es wird vermutet, dass die festere Bindung von HCMV-Virionen an Zelloberflächen nach primärer Interaktion mit Heparansulfaten durch Liganden-Rezeptor-Interaktionen vermittelt wird (Mocarski *et al.*, 2006). Die Anlagerung des Virions an die Zelloberfläche verursacht Veränderungen der Konzentrationen verschiedener intrazellulärer Botenstoffe (siehe oben). Diese Signalmilieuveränderungen ähneln denen, die durch den toll-like Rezeptor und den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor induziert werden (Mocarski *et al.*, 2006; Compton *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2003). Welche zellulären Rezeptoren bei der Bindung von gB eine Rolle spielen, wurde anhand von Versuchen mit nicht-membranassoziiertem gB untersucht und wird derzeit kontrovers diskutiert. So wurde unter anderem demonstriert, dass gB mit epidermalem Wachstumsfaktor-Rezeptor, toll-like Rezeptoren Typ-2 und β 1- und β 3- Integrinen interagiert (Wang *et al.*, 2003 und 2005; Boehme *et al.*, 2006; Isaacson *et al.*, 2007). Epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptoren vermitteln über ihren natürlichen Liganden, den epidermalen Wachstumsfaktor, wachstumsstimulierende Reize auf Epithelzellen. Toll-like Rezeptoren des angeborenen Immunsystems spielen eine Rolle in der Erkennung von extrazellulären Erregern, inklusive Viren. Integrine sind heterodimere Adhäsionsmoleküle mit einer α - und β -Untereinheit die für Zellhaftung, Zellmobilität, interzellulären Kontakt und Signalweiterleitung wichtig sind. Es bestehen Hinweise für eine Rolle von gB für die Zell-zu-Zell-Übertragung von HCMV und für Fusionen von Wirtszellen. Allerdings gibt es zu gB-induzierten Wirtszellfusionen widersprüchliche Ergebnisse (Navarro *et al.*, 1993; Tugizov *et al.*, 1995; Kinzler *et al.*, 2005). Zusätzlich scheinen Abschnitte des gB-Proteins den Transport von neu synthetisierten Virionen zu apikalen Zellmembranen zu vermitteln (Tugizov *et al.*, 1998).

Epitope von gB stellen Hauptziele neutralisierender Antikörper dar. gB-spezifische Antikörper können Virionenlagerung und damit den Zelleintritt unterbinden. Impfstoffe mit gereinigtem, rekombinanten gB werden derzeit in Phase-II-Studien klinisch untersucht. gB wird derzeit auch als geeignetes Ziel für neutralisierende Antikörper bei transplazentarer HCMV-Übertragung diskutiert (Mocarski *et al.*, 2006; Schleiss, 2005). Im Gegensatz zu Antikörperinteraktionen scheinen humane CD4-positive zytotoxische T-Lymphozyten nicht Genotypen abhängig mit gB-

Epitopen zu interagieren, sondern können sogar mit Schimpansen-CMV infizierte Zellen lysieren (Elkington *et al.*, 2004).

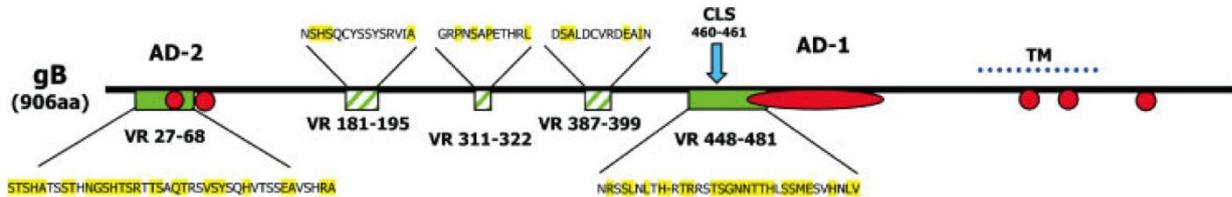


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung von Glykoprotein B als ungeschnittenes Polyprotein. Durch eine vergleichende Analyse aller in der GenBank abgelegten gB-Sequenzen können die variablen Proteinabschnitte graphisch dargestellt werden. Höher variable Abschnitte sind durch grüne Boxen dargestellt, weniger variable Bereiche durch grün-gestreifte Boxen. Innerhalb der dargestellten Aminosäureabfolgen weisen die in Gelb hinterlegten Bereiche variable Aminosäuren auf. Rot gekennzeichnete Bereiche zeigen bekannte immunrelevante Epitope. TM = der Bereich in dem der Transmembrananker vermutet wird; AD = antigenische Domäne; CLS = cleavage-site. (Aus Pignatelli *et al.*, 2004).

Bei einer Gesamtvariabilität von ca. 10% auf Aminosäureebene, liegt die Region der größten Variabilität von gB um die cleavage-site, im Bereich von etwa 448 bis 481 aa. Dort kann bis auf vorkommende Basenvariationen jeweils eines der fünf genotypischen Sequenzmuster beobachtet werden. Somit variieren die funktionellen und immunogenen Abschnitte der Aminosäureabfolge des Glykoproteins B von Virus zu Virus (Pignatelli *et al.*, 2004).

1.3.3 Glykoprotein B: Methodische Ansätze zur Erfassung genomischer Varianten

Im Jahr 1991 publizierten Chou *et al.* eine Untersuchung über die Variabilität von gB von HCMV. Mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) konnten Chou *et al.* im Bereich der cls, Basenpaare (Bp) 1161 bis 1839 vier distinkte gB-Genotypen unterscheiden. Zusätzlich etablierten Chou *et al.* einen Restriktionsverdau, der nach alleiniger Amplifikation eines 265 Bp langen Nukleinsäureabschnitts der cls mittels Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Analyse (RFLP) die Zuordnung einer HCMV-Probe zu den vier verschiedenen cls-Genotypen erlaubt (Chou *et al.*, 1991). Nachfolgend wurde die Methodik in über 30 Studien aufgegriffen, um Zusammenhänge zwischen der Prävalenz von gB-Genotypen und Art und Ablauf von HCMV-Infektionen herzustellen. Hierbei wurden überwiegend die Primer von Chou *et al.* eingesetzt. Analog erfolgte die Auswertung größtenteils mittels RFLP. In den Jahren 1998 und 2000 wurden weitere gB-Genotypen entdeckt. Shepp *et al.* (1998) untersuchten Patienten mit AIDS und fanden acht Stämme mit einem neuen gB-Genotyp (gB-Typ 5). Die so genannten gB-Typen 6 und 7 wurden in jeweils einem perinatal infiziertem Kind identifiziert (Trincado *et al.*, 2000).

Einleitung

Die bisher publizierten Arbeiten über genotypische Varianten von HCMV wurden von Pignatelli *et al.* (2004) zusammengetragen und diskutiert. Darauf aufbauend wurde für diese Arbeit eine Literaturrecherche vorgenommen, 34 Studien über gB-Genotypisierung ausgewählt und auf Methodik und Ergebnisse überprüft. Hierbei fielen teilweise Schwächen auf. Wesentlich für die Identifikation von Genotypen in Proben ist die sichere Amplifikation der entsprechenden gB-Sequenzabschnitte mittels PCR. Die von Chou *et al.* entwickelten Primer basierten auf wenigen verfügbaren gB-Sequenzen. Ein Vergleich der Primer mit den derzeit in der GenBank abgelegten gB-Sequenzen zeigt mehrere Basenfehlpaarungen der Primer mit verschiedenen gB-Typen. Von den hier untersuchten 34 neueren Studien nutzten jedoch 20 den sense- und 17 den antisense-Primer aus der Originalpublikation von Chou *et al.* von 1991.

Von den ausgewählten 34 Studien wurden zehn Studien mit einer einfachen PCR mit einem Primerpaar durchgeführt. Zwei Arbeiten benutzen eine semi-nested-PCR (Rasmussen *et al.*, 1997; Zheng *et al.*, 2002). 22 Studien amplifizierten Sequenzabschnitte mittels nested-PCR mit zwei Primerpaaren. In drei Studien wurde ein Gemisch von drei 5'-Primern und einem 3'-Primer eingesetzt (Vogelberg *et al.*, 1996; Meyer-König *et al.*, 1998a; Pacsa *et al.*, 2003). In lediglich drei Arbeiten wurden degenerierte Primer eingesetzt (Coaquette *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2002; Binder *et al.*, 1999). Bei 11 von 34 Studien wurden Virusamplifikate systematisch oder teilweise sequenziert. In 22 Studien wurden Proben ausschließlich mittels RFLP untersucht. Ein Restriktionsenzymverdau ermöglicht eine Einteilung nach den gB-Genotypen, kann aber nicht die wahre Anzahl von Sequenzvarianten im entsprechenden HCMV-Abschnitt zeigen. Zudem wurde gezeigt, dass RFLP teilweise fehlerhafte Ergebnisse bezüglich der Zuordnung zu gB-Genotypen gegenüber einer Sequenzierung mit anschließender Sequenzanalyse mit gB-Genotypen liefert (Trincado *et al.*, 2000; Chantaraarphonkun *et al.*, 2007). In einer Studie wurde nach Amplifikation eine Einzelstrang-Konformationspolymorphismus-Analyse (engl. Single Stranded Conformation Polymorphism, SSCP) durchgeführt (Coaquette *et al.*, 2004). Die PCR erfolgte mit Primern, die auf Sequenzinformationen von vor 1989 beruhen. Die Verwendung von SSCP erlaubte Coaquette *et al.* jedoch, multiple gB-Genotypen in einer Probe nachzuweisen. Studien, die mit degenerierten Primern arbeiteten und ihre Ergebnisse systematisch sequenzierten, wurden nur von Binder *et al.* (1998) sowie Zheng *et al.* (2002) durchgeführt. Insgesamt scheint ein gut evaluiertes PCR-System zur sicheren Detektion von gB-cls-Genotypen bisher nicht entwickelt zu sein.

1.3.4 Studienlage der Arbeiten zu Genotypen der cleavage-site von Glykoprotein B

Vierundzwanzig größere aussagekräftigere Studien, in denen die cleavage-site von gB in verschiedenen Patientenkollektiven untersucht wurde, sind in Tabelle 1.2 A bis C zusammengefasst. Die Anzahl der Studien, die keine statistischen Zusammenhänge zwischen gB-Genotyp und klinischem Verlauf aufzeigen konnten, ist in dieser Auswahl mit elf Studien nur unwesentlich kleiner als die der Studien, die Zusammenhänge aufzeigen konnten (insgesamt 13 Studien). Unter Berücksichtigung des sicherlich vorliegenden Publikationsbias und der Tatsache, dass etliche Studien kleineren Umfanges, die auch keine wesentlichen Zusammenhänge aufzeigen konnten und in dieser Auswahl nicht aufgeführt werden, scheint die derzeitige Studienlage nicht für eine monokausale Beteiligung von gB-cls-Genotypen an klinischen Verläufen zu sprechen.

A

Studien	Untersuchtes Patientenkollektiv	gB-Prävalenzen
Woo et al., 1997	Intrauterine Infektion	gB-1 prädominant
Gilbert et al., 1999	AIDS-Patienten	gB-2 prädominant
Fidouh-Houhou et al., 2001	AIDS-Patienten	gB-2 prädominant
Lukacs et al., 2001	Intrauterine Infektion	gB-1 prädominant

B

Studien	Untersuchtes Patientenkollektiv	Assoziation gB-Typ / klinischer Verlauf
Fries et al., 1994	Knochenmarkstransplantatempfänger	gB-1 / Gutartiger Krankheitsausgang
Shepp et al., 1996	AIDS-Patienten	gB-2 / Risiko einer CMV-Retinitis
Woo et al., 1997	Knochenmarkstransplantatempfänger	gB-2 / Risiko einer CMV-Erkrankung
Torok-Storb et al., 1997	Knochenmarkstransplantatempfänger	gB-3 & 4 / Risiko einer fatalen CMV-Erkrankung
Rosen et al., 1998	Leber-Transplantatempfänger	gB-1 / Episoden akuter Abstoßung
Pacsa et al., 2003	Nieren-Transplantatempfänger	gB-1 / Lebendspendernieren
Tarrago et al., 2003	AIDS-Patienten	gB-2 / Neurotropismus
Coquette et al., 2004	Immunsupprimierte Patienten	Detektion mehrerer gB-Genotypen / Transplantatabstoßung, hoher CMV-Last & Herpesvireninfectionen assoziiert

C

Studien	Untersuchtes Patientenkollektiv	gB-Prävalenzen bzw. Assoziation gB-Typ / klin. Verlauf
Vogelberg et al., 1996	Nierentransplantation	Keine signifikanten Zusammenhänge
Rasmussen et al., 1997	AIDS & Organ-Transplantatempfänger	
Chern et al., 1998	AIDS-Patienten mit CMV-Retinitis	
Meyer-König et al., 1998	Organ-Transplantatempfänger, Knochenmarkstransplantatempfänger	
Aquino et al., 2000	Transplantatempfänger & asympt. Infektionen	
Bale et al., 2000	Intrauterine Infektion	
Barbi et al., 2001	Intrauterine Infektion	
Sarcinella et al., 2002	Leber-Transplantatempfänger	
Arista et al., 2003	Intrauterine Infektion	
Vilas Boas et al., 2003	AIDS-Patienten	
Chantaraarphonkun et al., 2007	Immunsupprimierte Patienten	

Tabelle 1.2 A-C: Auswahl von Arbeiten zur cleavage-site des Glykoprotein B. A: Arbeiten, die eine Prävalenz eines bestimmten gB-Typen in einem Patientenkollektiv zeigten. B: Arbeiten, die eine Assoziation zwischen gB-Typen und klinischem Verlauf zeigen konnten. C: Arbeiten, die keine Zusammenhänge zwischen detektierten gB-Typen und Prävalenz und Verlauf bestimmen konnten (in Anlehnung an Pignatelli *et al.*, 2004).

Zudem zeigten Zusammenhänge wie die Assoziation einer HCMV-Retinitis bei AIDS-Patienten mit dem gB-2 widersprüchliche Ergebnisse (siehe Tabelle 1.2, Shepp *et al.*, 1996; Chern *et al.*, 1998). Coaquette *et al.* (2004) postulierten, dass das Vorkommen multipler gB-cls-Typen in immunsupprimierten Patienten einen Einfluss auf Transplantatabstoßung, HCMV-Last und Infektionen mit anderen Herpesviren haben könnte.

1.3.5 Rekombinationen von N-terminalen-, C-terminalen- und cls-Genotypen

Neben den Genotypen der cls wurden vier Genotypen für den gB-N-Terminus und zwei für den gB-C-Terminus vorgeschlagen (Meyer-König *et al.* 1998a). Meyer-König *et al.* definierten vier Prototyp-HCMV für die cls-Genotypen und deren N- und C-terminale Genotypen. Der N-terminale Bereich scheint variabler als der des C-Terminus. Von Haberland *et al.*, (1999) erfolgte eine experimentelle Untersuchung der cls-Genotypen 1-4 auf C-terminalen und N-terminalen genotypischen Varianten verschiedener wildtyp-HCMV. Von 44 untersuchten Viren hatten nur 22 eine den Prototypen entsprechende Konfiguration aller drei variablen Loci des gB-Gens, also beispielsweise cls-Typ 2 sowie C- und N-terminus Genotyp 2. Durch homologe Rekombination zwischen einzelnen genomischen Varianten der cls, des C- und N-Terminus scheint sich der Polymorphismus des gB-Gens weiter zu erhöhen. So lagen in der Hälfte der Fälle Rekombinationen vor, wie beispielsweise cls-Typ 3, C-terminus Typ 2 und N-terminus Typ 4 (Haberland *et al.*, 1999).

1.4 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

1.4.1 Vorkommen und Nomenklatur

G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren (GPCR, engl. für G-Protein-coupled receptor,) bilden die umfangreichste Protein-Superfamilie des Menschen. GPCR haben einen frühen evolutionären Ursprung und kommen neben Säugetieren auch in Viren, Bakterien, Hefen, Pflanzen etc. vor. Im menschlichen Genom liegen ca. 800 verschiedene GPCR vor (Kristiansen, 2004; Schöneberg *et al.*, 2004). Funktionell erlauben GPCR die Weiterleitung eines Signals von außerhalb der Zelle in das Innere der Zelle (Abb. 1.6). Dieses wird über heterotrimere G-Proteine (Guaninnukleotid-bindendes Protein) vermittelt. Es existieren jedoch analog zu GPCR auch 7-Transmembran-Rezeptoren, die Signale nicht über G-Proteine vermitteln. Es wurde somit vorgeschlagen, den Begriff „7-Transmembran-Rezeptor“ (7-TM) zu nutzen (Lefkowitz, 2004; Azzi *et al.*, 2003). In

Einleitung

höheren Lebewesen vermitteln GPCR die Erkennung von Stimuli wie Licht, Geruch, Geschmack, Hormonen und anderem. Die Schlüsselrolle von GPCR in vielen physiologischen wie pathologischen Vorgängen zeigt sich auch darin, dass die Wirkung von über 50% aller derzeit verschriebenen Medikamente über GPCR vermittelt wird (Rosenkilde *et al.*, 2006).

Viele Erkrankungen des Menschen sind auf GPCR zurück zu führen, und insgesamt ca. 600 aktivierende und ca. 100 inaktivierende Mutationen von GPCR sind bekannt. Mutierte GPCR sind für mehr als 30 distinkte Erkrankungen im Menschen verantwortlich, wie beispielsweise Retinitis pigmentosa, Hypo- und Hyperparathyreoidismus, nephrogenen Diabetes insipidus, verschiedene Infertilitätsstörungen sowie verschiedene Tumore (Schöneberg *et al.*, 2004).

Die 7-TM-Superfamilie des Menschen ist in fünf Unterfamilien einteilbar: die Rhodopsin-Familie, die Sekretin-Familie, die Glutamat-Familie, die Adhäsions-Familie und die frizzled/taste-Familie (Fredriksson *et al.*, 2003). Virale GPCR, auf die im Laufe dieser Arbeit eingegangen wird, gehören zu den Homologen von Chemokinrezeptoren, welche der Familie der Rhodopsin-Rezeptoren angehören. Die Rhodopsin-Familie lässt sich durch die Sequenz ihrer sieben Transmembran-Domänen von den anderen GPCR-Familien abgrenzen. Helix III enthält das hochkonservierte DRY-Motiv: Asparaginsäure (D), Arginin (R) und Tyrosin (Y) (Übersichtsarbeit von Mirzadegan *et al.*, 2003).

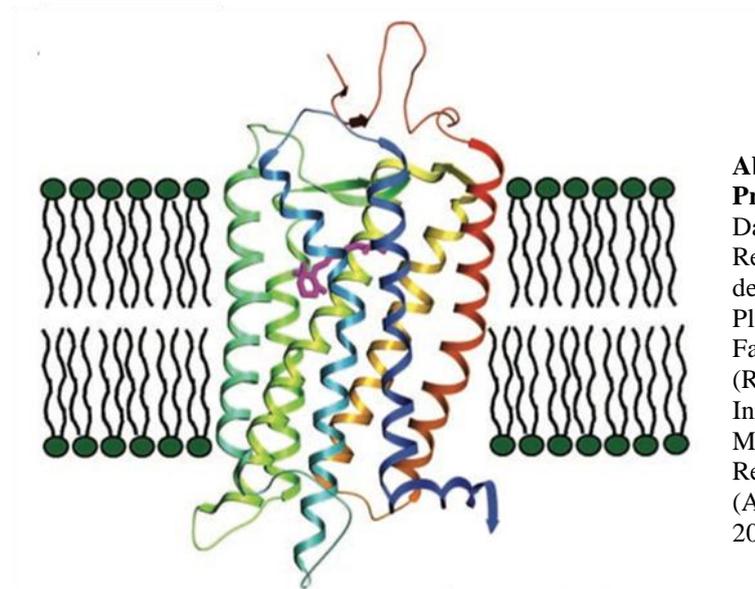


Abbildung 1.6: Strukturmodell eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors. Schematische Darstellung eines Rhodopsin-7-Transmembran-Rezeptors in der Zellmembran. Die Darstellung der Transmembran-Domänen in der Plasmamembran der Zelle folgt einem Farbgradienten: extrazellulärer N-Terminus (Rot) bis intrazellulärer C-Terminus (Blau). Innerhalb des Rezeptors ist Retinal, das Molekül, welches mit Licht interagiert und den Rezeptor aktiviert, dargestellt (Magenta) (Abbildung verändert, nach Palczewski *et al.*, 2000; Cabrera-Vera *et al.*, 2003).

1.4.2 Räumliche Struktur von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

Die Basis der Superfamilie von GPCR oder 7-TM ist das Vorkommen von sieben membrandurchspannenden, hydrophoben α -Helices, einem extrazellulären N-Terminus, einem intrazellulären C-Terminus, drei extrazellulären Schleifen und drei zytoplasmatischen Schleifen

(Weinstein *et al.*, 1994). Der Amino-Terminus, als extrazellulärer Anteil, wird durch das extrazelluläre Milieu beeinflusst, z.B. durch Bindung von Liganden. Die Länge des N-Terminus variiert von wenigen Aminosäuren bis zu über 500 Aminosäuren. Die Transmembranhelices bestehen aus ca. 20 bis 27 Aminosäuren und laufen entgegen dem Uhrzeigersinn (Palczewski *et al.*, 2000). Die extrazellulären Schleifen einiger GPCR dienen der Interaktion mit Liganden. Zwischen extrazellulären Schleifen können sich Disulfidbrücken ausbilden, so zum Beispiel bei GPCR der Rhodopsin-Familie zwischen der zweiten und der dritten extrazellulären Schleife. Diese scheinen eine wichtige Rolle in der Stabilisierung der Konformation der extrazellulären Helices zu spielen. Die intrazellulären Schleifen enthalten Stellen, die mit dem G-Protein interagieren und weisen außerdem Phosphorylierungsstellen auf. Auch der Carboxy-Terminus von GPCR enthält potentielle Stellen für Phosphorylierungen. Dort findet zudem die Interaktion mit G-Proteinen statt (Übersichtsarbeiten von Cabrera-Vera *et al.*, 2003 und Kristiansen, 2004).

1.4.3 Signalweiterleitung über heterotrimere G-Proteine

Heterotrimere G-Proteine bestehen aus den Untereinheiten α , β und γ . Es existieren mindestens 28 distinkte α -Untereinheiten, fünf verschiedene β - und 12 verschiedene γ -Untereinheiten (ohne jeweilige Splice-Varianten). β - und γ -Untereinheiten sind eng assoziiert und können als eine funktionelle Untereinheit betrachtet werden. Im inaktiven Zustand ist die α -Untereinheit mit dem β - γ -Komplex assoziiert und an Guanosindiphosphat (GDP) kovalent gebunden. Natürliche Liganden, die inaktive GPCR aktivieren können, reichen von subatomaren Partikeln (Photonen), Ionen (H^+ und Ca^{2+}), kleinen organischen Molekülen bis zu Proteinen. Diese extrazellulären Signale können den Transmembran-Rezeptor aktivieren, und verändern so dessen Konformation. Die Konformationsänderung erlaubt dem Rezeptor als Guanosintriphosphat (GTP)-Austauschfaktor zu fungieren. So aktiviert der Rezeptor durch Austausch von GDP zu GTP die α -Untereinheit des G-Proteins. Das aktivierte G-Protein erfährt eine destabilisierende Konformationsveränderung, wodurch die α -Untereinheit vom β - γ -Komplex abdissoziiert. Hierdurch wird die weitere Signaltransduktion im intrazellulären Raum vermittelt (Übersichtsarbeit von Cabrera-Vera *et al.*, 2003).

Die α -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine können in vier Familien eingeteilt werden (Die zugehörigen Subtypen in Klammern): G_s (G_s , G_{olf}), G_i (G_{tr} , G_{tc} , G_g , G_{il-3} , G_o , G_z), G_q (G_q , G_{11} , G_{14} , $G_{15/16}$) und G_{12} (G_{12} , G_{13}). Die Effektormoleküle der G-Proteine können Enzyme oder Ionenkanäle sein. Teilweise kann den $G\alpha$ -Typen ein spezifischer Effektor zugeordnet werden. Exemplarisch genannt sei hier die Aktivierung der Adenylatcyclase durch die $G\alpha_s$ -Untereinheit.

Einleitung

Diese bildet intrazelluläres zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), welches als „second messenger“ dient. Im Gegensatz zu der α -Untereinheit haben die verschiedenen Typen von β - und γ - Untereinheiten der GPCR kaum Auswirkungen darauf, welche Effektormoleküle aktiviert werden (Cabrera-Vera *et al.*, 2003).

Das aktivierte Stadium des G-Proteins wird durch Hydrolyse des GTP zu GDP beendet. Dies geschieht durch die intrinsische GTPase-Aktivität der α -Untereinheit des G-Proteins, und diese wird durch GTPase aktivierende Proteine (GAP) entscheidend mitreguliert. Nachfolgend kann die α -Untereinheit wieder mit dem β - γ -Komplex reassoziieren. Der Rezeptor ist dann wieder aktivierbar (Cabrera-Vera *et al.*, 2003).

Es wird vermutet, dass GPCR einen einheitlichen Aktivierungsmechanismus besitzen, um intrazellulär mit Botenstoffen zu interagieren. Hinweise dazu geben Sequenzvergleiche der zytoplasmatischen Enden der Transmembransegmente der zweiten und dritten zytoplasmatischen Schleife. Diese Regionen scheinen mit dem G-Protein zu interagieren (Übersichtsarbeit von Mirzadegan *et al.*, 2003). Extrazelluläre Rezeptoraktivierung veranlasst einen Isomerisierungsschritt, der den allosterischen Zustand des Rezeptors verändert. Es konnten nach Aktivierung des Rezeptors Bewegungen innerhalb des dritten und sechsten Transmembransegments gezeigt werden (Ghanouni *et al.*, 2001, Palczewski *et al.*, 2000). Diese helikalen Bewegungen erlauben scheinbar die Bindung des G-Proteins.

1.4.4 Oligomerisierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

Es wird vermutet, dass GPCR als Heterodimere oder Oligomere vorliegen können (Maggio *et al.*, 1993, Hebert *et al.*, 1996). So konnte in Studien nachgewiesen werden, dass in lebenden Zellen sowohl Homo- als auch Heterodimere existieren. Zur Passage von „Qualitätskontrollprüfungen“ nach der zellulären Proteinbiosynthese, für Rezeptoraktivierung und Zelloberflächenexpression kann die Dimerisierung ein obligater Schritt sein (Übersichtsarbeit von Bulenger *et al.*, 2005).

1.5 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren in CMV

1.5.1 „Gen-pirating“ von Viren

Seit mehreren Millionen Jahren koexistieren Viren und höher entwickelte Lebewesen. Da Viren auf Lebewesen angewiesen sind, um sich in ihren Zellen zu replizieren, erfüllen sie damit nicht die Definition eines sich selbst reproduzierenden Lebewesens. Jedoch unterlagen sie dem

Einleitung

Selektionsdruck der Evolution und erfuhren funktionelle Sequenzveränderungen um den Abwehrmechanismen ihrer Wirtszellen widerstehen zu können. Eine hochkomplexe Interaktion zwischen Wirt und Virus hat sich geformt. Nach dem derzeitigen Wissensstand wird das Immunsystem des Menschen von mindestens 50 Peptid-Agonisten (Chemokinen) sowie über 20 GPCR (Chemokinrezeptoren) beeinflusst. Interaktionen von Chemokinen mit Chemokinrezeptoren steuern die Differenzierung myeloischer- und lymphoider-Vorläuferzellen und damit die Leukozyten-Homeostase, die Leukozyten-Migration und den Ablauf von Entzündungsreaktionen.

Die Eigenschaften von Viren in ihrer vielfältigen Interaktion mit dem Immunsystem konnte bisher am umfassendsten bei Herpesviren dargestellt werden. Das Genom der Herpesviren kodiert in einem nicht unbeträchtlichen Umfang für Gene mit immunmodulativen Effekten, die sie ursprünglich vom Wirt erworben und für ihre Zwecke strukturell optimiert haben. Zu den erworbenen Genen gehören vor allem solche, die für Chemokine, Chemokin-Rezeptoren oder MHC-Klasse-I-Moleküle sowie andere, nicht näher klassifizierte mit Chemokinen interagierende Moleküle kodieren (Mocarski *et al.*, 2006; Murphy, 2003). GPCR als „pirated“ (dt. etwa „gestohlene“), viral veränderte Chemokinrezeptoren scheinen eine entscheidende Rolle in verschiedenen Ereignissen der Virusinfektion zu spielen, so unter anderem Immunevasion, Gewebeerkenntung, Zelleintritt, zelluläre Umprogrammierung, virale Replikation und Zellmigration (Murphy, 2003).

Bisher konnten ca. 30 distinkte Chemokin- oder Chemokin-Rezeptor-Mimikris von verschiedenen Viren identifiziert werden, vor allem in den großen DNA-Viren wie Herpes- und Poxviren als auch in RNA-Viren, wie den Retroviren. Humanpathogene Vertreter mit Chemokin-Rezeptor Mimikris sind HCMV, HHV-6, HHV-7 und HHV-8, Molluscum contagiosum-Virus sowie HIV.

1.5.2 Familien von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren in CMV

Alle humanen β -Herpesviren enthalten GPCR. Gruppen von homologen GPCR, die analog in verschiedenen Viren vorkommen, werden als Familien zusammengefasst. Die U51-GPCR-Familie wird von HCMV, HHV-6 und HHV-7 kodiert. In HHV-6 und -7 werden die U51-GPCR im frühen Stadium der Infektion exprimiert, scheinen verschiedene Chemokine zu binden und die Transskription von CCL5 (auch RANTES genannt, Abk. für „regulated on activation, normal T cell expressed and secreted“) zu vermindern (Milne *et al.*, 2000). HCMV kodiert in UL78 einen GPCR, der als Vertreter der U51-Familie angesehen wird.

Einleitung

Die andere in β -Herpesviren vorkommende GPCR-Familie ist die UL33-Familie. Diese kommt in Primaten-, Maus-, Ratten- und Meerschwein-CMV vor. Ebenfalls zu der UL33-Familie gehört der U12-Rezeptor des HHV-6 und des HHV-7. Beide U12-Rezeptoren binden CC-Chemokine als Liganden und signalisieren über Wege, die nicht $G\alpha_i$ abhängig sind, was zu einem transienten Calcium-Fluss führt (Isegawa *et al.*, 1998).

Die von HCMV kodierten ORF US27, US28, UL33 und UL78 weisen 7-TM-typische Domänen auf und könnten somit GPCR kodieren. Bisher konnte allerdings nur für UL33 und US28 gezeigt werden, dass sie exprimiert werden und für funktionelle GPCR kodieren (Mocarski *et al.*, 2006; Casarosa *et al.*, 2001). Rigoutsos *et al.* (2003) identifizierten in einer computerbasierten Untersuchung des HCMV-Genoms insgesamt 15 Sequenzbereiche, die 7-TM-Domänen aufweisen. US12 und US14 zeigten neben den bisher vermuteten GPCR eine relativ hohe Homologie zu 7-TM-Rezeptoren. Weitere neun putative 7-TM-ORF sind: UL100, US13, US15, US16, US17, US18, US19, US20 und US21. Hierbei konnten jedoch keine direkten Homologien zu bekannten 7-TM gezeigt werden, vielmehr wiesen jeweils vereinzelte Abschnitte der Sequenzbereiche Homologien zu verschiedenen bekannten 7-TM auf (Rigoutsos *et al.*, 2003).

UL33 und UL78 kommen in allen bekannten HCMV vor. UL33 zeigt eine relativ hohe Homologie zu M33 und R33, verglichen mit der Homologie zwischen den Vertretern der UL78-Familie in humanen-, Maus- beziehungsweise Ratten-CMV (Oliveira *et al.*, 2001; Vischer *et al.*, 2006). Innerhalb der humanen HCMV-Stämme weist jedoch UL33 die höchste Variabilität aller GPCR auf (Abbildung 1.4, Dolan *et al.*, 2004). US27 und US28 konnten bisher nur in humanen- und Schimpansen-CMV-Stämmen nachgewiesen werden (Übersichtsarbeit von Vischer *et al.*, 2006).

US27 wird in der late-phase in HCMV-infizierten Zellen exprimiert. Das US27-Genprodukt wird N-glykosyliert und kommt sowohl in infizierten Zellen als auch in Viruspartikeln vor. Eine Aktivität über G-Protein-Kopplung konnte bisher nicht aufgezeigt werden (Margulies *et al.*, 2007).

US28 hat die höchste Homologie zu humanen Chemokinrezeptoren der viralen GPCR von HCMV. US28 signalisiert ligandenunabhängig (konstitutiv) und verändert das intrazelluläre Signalmilieu über G_q -Protein-Aktivierung. Spezifische Interaktion mit CC- und CX3C-Chemokinen konnten außerdem nachgewiesen werden. US28 wird in latent infizierten Monozyten transskribiert (Beisser *et al.*, 2001). US28 dient als Korezeptor für verschiedene HIV-Stämme beim Zelleintritt (Pleskoff *et al.*, 1997).

Die Datenlage zu den funktionellen Eigenschaften von UL33 ist nicht so umfangreich wie die zu US28. Der UL33-Rezeptor ist über verschiedene G-Proteine konstitutiv aktiv. Im Gegensatz zu

Einleitung

US28 konnte bis dato noch kein Ligand für UL33 identifiziert werden, der die konstitutive Aktivität des Rezeptors beeinflussen könnte. Rigoutsos *et al.* (2003) weisen auf eine Homologie von UL33 zu dem humanen Galanin Rezeptor Typ 3 hin. Dieser kommt mit seinem Liganden, Galanin, einem Neuropeptid, im humanen Nervensystem vor und wird mit Angst- und Depressions-Verhalten assoziiert. Margulies *et al.* (1996) zeigen in einem Nukleinsäure-Vergleich, dass der humane Chemokinrezeptor CCR1 UL33 am ähnlichsten scheint. Dies gilt auch für US28 und US27, wobei diese eine etwas größere Ähnlichkeit zu CCR1 zeigen als UL33. Eine Basic Local Alignment Search Tool (Blast) Untersuchung der GenBank zeigt auf Proteinbasis eine Homologie des putativen, gespleißten UL33-Proteins zu dem humanen Chemokinrezeptor CCR1, ferner zu den Chemokinrezeptoren CCR2 und CCR3. Des Weiteren besteht eine Homologie zu HM145, einem vermuteten humanen Leukozyten-GPCR für chemotaktische Peptide (Nomura *et al.*, 1993).

1.5.3 Auswirkungen viraler GPCR: UL33 aus Nager-CMV in knock-out-Versuchen

Hinweise auf den Einfluss von HCMV-kodierten GPCR auf das intrazelluläre Signalmilieu wurden anhand von Tierexperimenten mit M33, dem Maus-CMV (MCMV) Homolog zu UL33, und R33, dem Ratten-CMV (RCMV) Homolog zu UL33, erbracht. Da UL33 nicht essentiell für Replikation von HCMV ist, konnte anhand von Untersuchungen in Mäusen und Ratten mit M33-beziehungsweise R33-deletierten HCMV die wichtige Rolle von viralen GPCR dargestellt werden. Ein R33 deletierter RCMV-Stamm bei infizierten Ratten erzeugt eine geringere Mortalität als ein RCMV-Wildtyp-Stamm. Bei M33-deletierten MCMV-Stämmen konnten *in vitro* im Vergleich zum Wildtyp keine Veränderungen des Phänotyps festgestellt werden, wobei *in vivo* eine stark verminderte Replikation von M33-deletiertem MCMV in Speicheldrüsen nachgewiesen werden konnte (Davis-Poynter *et al.*, 1997). Analog wurde gezeigt, dass *in vivo* bei R33-Deletion eine verminderte Replikation in Speicheldrüsenepithelien stattfindet, wobei R33-intakte RCMV-Stämme hohe Viruslasten in Speicheldrüsenepithelien erzeugen.

1.5.4 Exprimierung, Spleißen und Glykosylierung von Vertretern der UL33-Familie

UL33 ist für die Proliferation von HCMV nicht essentiell und UL33-knock-out-HCMV amplifizieren *in vitro* wie Wildtyp-HCMV (Dunn *et al.*, 2003). US28 und UL78 werden nach der immediate-early-Protein-Expression transskribiert, während es bei UL33 und US27 in der late-phase der Infektion stattfindet (Mocarski *et al.*, 2006). Allerdings konnten für UL33 und M33 Transskripte schon drei bis vier Stunden nach Infektion nachgewiesen werden (Davis-Poynter *et*

al., 1997). Der UL33-ORF beinhaltet ca. 1293 Bp.

Für UL33 und M33 sind Spleißprozesse bekannt, nicht aber für R33 (Davis-Poynter *et al.*, 1997; Beisser *et al.*, 1998; Casarosa *et al.*, 2003a). Ein 121 Bp langes Intron im 5'-Bereich teilt UL33 in Exon-1 von ca. 24 Bp und Exon-2 von 1212 Bp (Davis-Poynter *et al.*, 1997; Casarosa *et al.*, 2003a). *In vitro* zeigt das Translationsprodukt von Exon-1-deletiertem UL33 im Gegensatz zu dem Translationsprodukt des vollständigen UL33 keine Lokalisation in der Zellmembran. Außerdem fehlt Exon-1-deletiertem UL33 die konstitutive Aktivität (Casarosa *et al.*, 2003a). Auch die Veränderung eines Motivs zwischen den Aminosäuren 306 und 328 des UL33 zeigt eine ausbleibende Lokalisation des Rezeptors zur Zellmembran (Casarosa *et al.*, 2003a; Grujithuijsen *et al.*, 2004).

Das UL33-Genprodukt ist ein 36 kDa Protein, das über N-glykosidische Bindung über Asparagin als ein Glykoprotein von 58 kDa in zytoplasmatischen Einschlüssen nachgewiesen werden kann (Margulies *et al.*, 1996).

1.5.5 Darstellung viraler GPCR in Zellen

UL33 und US27 wurden von Fraile-Ramos *et al.* (2002) auf ihre Zelllokalisierung in transfizierten humanen Zellen untersucht. UL33 und US27 konnten nur in geringem Ausmaß auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Der Großteil lokalisierbarer Rezeptoren zeigte sich in intrazellulären Organellen in der perinukleären Zone (möglicherweise Vesikel des endozytischen pathways), multivesikulären Endosomen (Zellorganellen, die im endozytischen Stoffwechselweg unter anderem für die Sortierung und Degradation von Transmembranproteinen zuständig sind) und Teilen des endoplasmatischen Retikulums (Membranvesikel und Membrantubuli).

Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten eine Kolo-kalisation von gB und gH mit UL33, US27 und US28 in Endosomen infizierter Zellen. Dies ließe vermuten, dass UL33, US27 und US28, analog zu gB und gH, in die Virushülle integriert werden (Fraile-Ramos *et al.*, 2002). Sowohl US27 als auch US28 unterliegen konstitutiver Endozytose und im Fall von US28 besteht auch eine Wiederverwendung des GPCR (Fraile-Ramos *et al.*, 2001). Insgesamt kommen US27, US28 und UL33 aber vor allem in endosomalen Organellen vor und somit ist die Verteilung dieser viralen GPCR nicht mit der von humanen Chemokinrezeptoren vergleichbar. Schon 1996 gab es Hinweise aus Antikörperuntersuchungen, dass UL33 in dense bodies, umhüllten intrazellulären Partikeln, aber auch in Virionen vorkommt (Margulies *et al.*, 1996).

1.5.6 Funktionelle Eigenschaften CMV-kodierter GPCR

Trotz der Sequenzähnlichkeit zu Chemokinrezeptoren konnte für UL33, UL78 und US27 noch keine Interaktion mit Chemokinen nachgewiesen werden. Für den von US28 kodierten Rezeptor konnte jedoch gezeigt werden, dass dieser mit dem Chemokin CX3CL1 (Fractalkine) und den CC-Chemokinen CCL2, 3, 4, 5, 7, 11, 13, 26 und 28 interagiert. CX3CL1 wirkt als inverser Agonist und kann sowohl membrangebunden als auch gelöst vorkommen. Membrangebunden dient es US28 der Adhäsion an Wirtszellen und erleichtert damit die Infektion (Kledal *et al.*, 1998). CX3CL1 wird beispielsweise von Endothelzellen exprimiert, die pro-inflamatorischen Zytokinen ausgesetzt sind. UL33 bindet keines der bekannten Chemokine, wobei M33 in der Maus eine Aktivitätsveränderung auf murines CCL5 zeigt (Melnychuk *et al.*, 2005).

CMV-Rezeptor	G-Protein Aktivierung	Konstitutive Aktivität	Pathway-Aktivierungen	Ligandenabhängige Veränderungen der Signalgebung durch	Chemokinbindung von	Migration glatter Muskelzellen
US28	G α_q	ja	CREB, MAPK, NF-kappa-B, Phospholipase C / IP $_3$	CX3CL1	CCL2, 3, 4, 5 (RANTES), 7, 11, 13, 26, 28, CX3CL1 (fractalkine)	ja
UL33	G $\alpha_{q/sr/o}$	ja ¹	CREB, Rho / p38, Phospholipase C / IP $_3$ ¹	n.b.	n.b.	Nein
M33	G α_q	ja	CREB, MAPK, NF-kappa-B, Phospholipase C / IP $_3$	CCL5	n.b.	ja
R33	G $\alpha_{q/i/o}$	ja	CREB-Inhibition, NF-kappa-B, Phospholipase C / IP $_3$	n.b.	n.b.	ja

Tabelle 1.3: Eigenschaften von HCMV-kodierten G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. ¹ = Es bestehen z.T. widersprüchliche Ergebnisse (Casarosa *et al.*, 2001 und 2003; Waldhoer *et al.*, 2002). CREB = cAMP response element-binding protein; MAPK = mitogen-activated protein kinase; IP $_3$ = Inositoltriphosphat; CX3CL1 = Chemokin (mit C-X3-C Motiv) Ligand 1; CCL = Chemokin (mit C-C Motiv) Ligand; n.b. = nicht bekannt

Im Gegensatz zu Chemokinrezeptoren, die primär G $_{i/o}$ -Protein-gekoppelt sind, zeigen HCMV-kodierte Rezeptoren wie UL33 keine G-Protein-Spezifität, sondern sie aktivieren verschiedene G-Proteintypen: UL33 aktiviert G $_q$ -Proteine (NF-kappa-B-Aktivierung), G $_s$ -Proteine und G $_i$ -Proteine (cAMP-responsive element (CRE)-Aktivierung), (Casarosa *et al.*, 2001 und 2003; Waldhoer *et al.*, 2002). US28 aktiviert G $_q$ -Proteine. Die Aktivierung von G $_{i/o}$ -Protein erfolgt bei UL33 durch den C-terminalen Anteil, bei R33 erfolgt dies unabhängig vom C-Terminus (Casarosa *et al.*, 2003a). R33 und M33 aktivieren konstitutiv G-Proteine (Waldhoer *et al.*, 2002

und 2003; Gruijthuijsen *et al.*, 2002). R33 interagiert mit $G_{i/o}$ - und G_q -Proteinen, M33 mit G_q -Proteinen (Gruijthuijsen *et al.*, 2002; Casarosa *et al.*, 2003a; Sherill *et al.*, 2006).

Der UL33-kodierte Rezeptor verändert durch konstitutive Aktivität das zelluläre Signalsystem. Dies konnte von Casarosa *et al.* sowohl in transfizierten, also auch in HCMV-infizierten Zellen gezeigt werden (Casarosa *et al.*, 2003a). UL33 vermittelt sowohl eine verstärkte Aktivität der Phospholipase C als auch die Akkumulation von Inositoltriphosphat (IP_3) via $G_{q/11}$ und $G_{i/o}$ (Casarosa *et al.*, 2003a). Durch UL33 erfolgt eine Erhöhung der CRE-Aktivität via $G_{i/o}$ und G_s (Casarosa *et al.*, 2003a). Die CRE-Aktivierung durch UL33 scheint nicht von einzelnen Schleifen des Rezeptors abhängig zu sein. Vielmehr muss unter Beteiligung der zytoplasmatischen Schleifen und anderer Rezeptoranteile eine Aktivierung des pathways stattfinden (Gruijthuijsen *et al.*, 2002). Diese Veränderungen des intrazellulären Signalmilieus sind bis zu 48 Stunden nach HCMV-Infektion nachweisbar. Die Veränderungen des intrazellulären Botenstoff-Milieus durch UL33 sind Zelltyp-spezifisch und hängen vom zellulären Signalosom ab (Casarosa *et al.*, 2001 und 2003a).

1.5.7 Zellmigration und CMV-GPCR

US28 vermittelt eine Migration von glatten Muskelzellen über SRC-Kinasen und fokale Adhäsionskinasen. Hierfür ist ein CCL2-haltiges Umfeld notwendig, wobei auch CCL5 eine Migration induzieren kann. Sowohl CCL2 als auch CCL5 sind Chemokine, die bei Endothelläsionen freigesetzt werden, wie bei der Entwicklung von Arteriosklerose, Restenosen von Läsionen und bei Vaskulopathien im Rahmen von chronischen Abstoßungsreaktionen. Hierbei könnte HCMV durch eine rezeptorvermittelte Mobilisierung von glatten Muskelzellen zu den genannten Pathologien beitragen (Streblow *et al.*, 1999 und 2003).

Streblow *et al.* (1999) zeigten, dass nach Deletion von US28 keine Migration von glatten Muskelzellen mehr stattfindet. Somit scheint eine Beteiligung anderer GPCR als US28 in HCMV unwahrscheinlich. Jedoch wird davon ausgegangen, dass zumindest auch M33 von HCMV eine Rolle bei der Migration von glatten Muskelzellen spielen könnte. Hier konnte durch Stimulation mit CCL5 *in vitro* eine Induktion der Abwanderung von glatten Muskelzellen gezeigt werden. Analog hierzu zeigt R33 *in vitro* eine Induktion der Migration von glatten Muskelzellen, wobei R33-deletiertes HCMV keine Migration induzieren kann (Streblow *et al.*, 2005). Weiter konnten Streblow *et al.* (2005) aufzeigen, dass die Rate chronischer Abstoßung und vaskulärer Sklerose der Transplantatgefäße in einem Lewis-Ratten-Herztransplantations-Modell von dem Vorkommen von R33 in HCMV-infizierten Ratten abhängen.

Zielstellungen dieser Arbeit

Bei bisher unpublizierten Untersuchungen des gB-Gens (UL55) von B. Ehlers *et al.* konnten hochdivergente CMV-Genotypen in Primaten nachgewiesen werden. Um HCMV auf verschiedene Genotypen untersuchen zu können, werden geeignete PCR-Systeme für die entsprechenden Genbereiche benötigt. Für das gB-Gen sollte eine PCR mit degenerierten Primern entwickelt werden, die hochsensitiv auch divergente gB-Genotypen detektieren kann. Das PCR-System sollte evaluiert, optimiert und an Primaten-CMV auf seine Vielseitigkeit überprüft werden.

Viral kodierte GPCR stellen vor allem wegen der Möglichkeit einer pharmakologischen Beeinflussung der HCMV-Infektion eine interessante Gruppe von Virusproteinen dar. In einem *in silico* Vergleich von Dolan *et al.* (2004) zwischen Sequenzen verschiedener HCMV-Stämme stellte sich UL33 als variabelster aller HCMV-kodierten GPCR dar. In der vorliegenden Arbeit soll überprüft werden, ob in Wildtyp-HCMV-Stämmen distinkte UL33-Genotypen vorkommen. Dazu sollen bekannte Sequenzen aus der GenBank zusammengefasst und daraus ein PCR-System für UL33 entwickelt werden, das die gleichen Anforderungen wie das gB-PCR-System erfüllt.

Um bei mit mehreren UL55- oder UL33-Genotypen infizierten Humanproben die einzelnen Genotypen der Proben jeweils sicher darstellen zu können, sollten in den PCR zusätzlich locked-nucleic-acid Oligonukleotide (LNA) eingesetzt werden. Durch Einsatz von LNA-substituierten Oligonukleotiden konnten Prepens *et al.* (2007) selektiv aus mischinfizierten Proben DNA-Polymerase-Gene einzelner primaten Herpesviren über eine degenerierte Panherpes-Konsensus-PCR amplifizieren. LNA sollten in dieser Arbeit spezifisch durch Anlagerung an einzelne Genotypen deren Amplifikation in der PCR unterbinden und damit die Amplifikation anderer Genotypen aus einer Probe erlauben. Bei Eignung von LNA für diese Anwendung sollten für die verschiedenen gB- und UL33-Genotypen jeweils spezifische LNA konzipiert werden. Durch Kontrollversuche sollte der Einsatz von LNA in der PCR evaluiert und optimiert werden. Abschließend sollten Proben humanen Ursprungs auf gB- und UL33-Genotypen untersucht werden, wobei vorkommende Mehrfachinfektionen mittels LNA-Einsatz nachgewiesen werden sollten.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Puffer und Lösungen

Agarose	Invitrogen, UK
Agarosegel-Laufpuffer 0,5x TBE [aus 10x TBE (1 M Tris, 0,9 M Borsäure, 0,01 M EDTA)]	Invitrogen, UK
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, BRD
DNA-Farbstoff GelRed (Im Verhältnis 1 : 20.000 im Agarosegel)	Biotium, USA
DNA-Probenpuffer (5 Teile Bromphenolblau, 7 Teile 70% Sucrose in H ₂ O)	Serva, BRD
H ₂ O (Dnase / Rnase frei)	Fluka, Schweiz
MgCl ₂ -Lösung	Applied Biosystem, USA
Nukleotidmix (dNTPs)	Applied Biosystem, USA
PCR-Puffer (10fach)	Applied Biosystem, USA

2.1.2 DNA-Längenstandards

φX174 DNA- <i>Hae</i> III Digest	New England Biolabs, USA
100bp DNA ladder (siehe Abbildung 2.1)	New England Biolabs, USA
λ <i>Hind</i> III Digest	New England Biolabs, USA
Lambda <i>Bst</i> EII (siehe Abbildung 2.1)	New England Biolabs, USA

2.1.3 Kits

AmpliTaq Gold DNA Polymerase	Applied Biosystems, USA
DNA Sequencing (BigDye 3.1)	Applied Biosystems, USA
Invisorb Spin PCRapid	Invisorb, BRD
QIAquick PCR Purification	Qiagen, BRD
Dneasy-Blood Kit	Qiagen, BRD

2.1.4 Geräte

Agarose Gelelektrophoresekammern	Biometra, BRD
Feinwaagen	Sartorius, BRD
Heraeus Fresco 21 Zentrifuge	Heraeus, BRD
Intas UV System Fotodokumentationsanlage	Intas, BRD
Biometra TGradient Thermocycler	Biometra, BRD
Nanodrop® Spectrophotometer	NanoDrop Technologies, USA
Standard Power Pack P25 Spannungsgeräte	Biometra, BRD
T Gradient Thermocycler	Biometra, BRD

2.1.5 Software

Blast (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)	National Center for Biotechn. Information, USA
Lasergene DNA-Suite 6	DNASTAR, USA
Mac Vector 8.1.1 und 9.5	Accelrys Inc, USA
Primer Premier 5.0	Premier Biosoft Int., USA
4 Peaks	Mek&Tosj, Niederlande
LNA-Tools (http://lnatools.com)	Exiqon, Dänemark

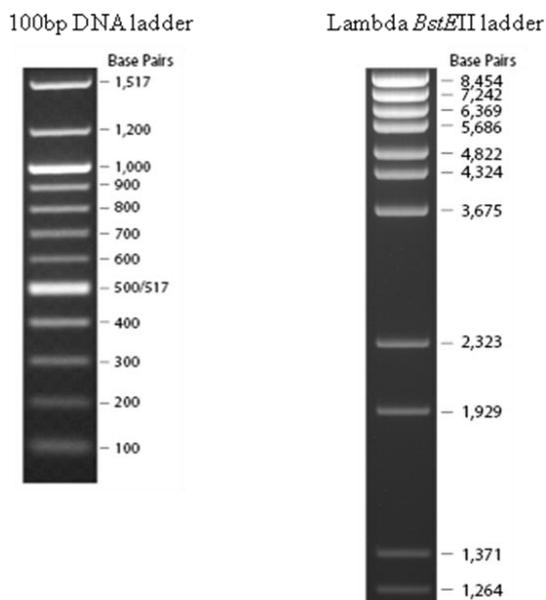


Abbildung 2.1: DNA-Längenstandards 100 bp DNA ladder und Lambda *BstEII*. Die Banden der Marker im Agarosegel entsprechen DNA-Molekülen der angegebenen Basenpaarzahl. Base pairs = Basenpaare.

2.1.6 PCR-Primer

Alle Primer wurden von der Firma Metabion International AG (Martiensried, BRD) in Konzentrationen von 100 μ M bezogen. Sie wurden auf eine Gebrauchslösung von 10 μ M eingestellt, und die Lagerung erfolgte bei -20°C. Tabelle 2.1 listet alle in dieser Arbeit verwendeten Primer auf.

Die Primer wurden jeweils anhand von geeigneten Matrize-Sequenzen mit dem Programm Primer Premier 5.0 ausgewählt. Hochkonservierte Abschnitte wurden anhand von alignments lokalisiert und mittels Primer Premier 5.0 auf ihre Eignung als Primer überprüft. Unter den verwendeten default-Einstellungen überprüft Primer Premier Schmelztemperatur (T_m), G/C-Gehalt, die Möglichkeiten der Ausbildung von Primerdimeren und Sekundärstrukturen sowie Fehlpaarungen innerhalb der Matrizen-Sequenz für alle möglichen Primervarianten.

A) Primersets für Glykoprotein B

Primer-bezeichnung	Primersequenz	Degenerationsfaktor	Amplifikatgröße
4006-s	AGCACCTGGCTCTATCGTG	1	948 Bp
4006-as	TCATATCACGCAGCACCTT	1	
4007-s	GGTGACGTGGTTGACAT (N/i) TC (N/i) CC	25	803 Bp
4007-as	GCAATCGGTTTGTGTA (N/i) AT (N/i) GC	25	
4125-s	GCGGACTCGGTGAT (B/i) TC (N/i) TGGGA	20	554 Bp
4125-as	GCTGACGGGTTGATCTTGCT (R/i) AG	3	
4008-s	CTGCCAAAATGAC (N/i) GC (N/i) AC (N/i) TT	125	483 Bp
4008-as	GAATGGCTGA (N/i) GGRTT (N/i) ATYTT	25	

B) Primersets für UL33

Primer-bezeichnung	Primersequenz	Degenerationsfaktor	Amplifikatgröße
4208-s	GGGTAAGTGTAGCCGCGACG	1	2630 Bp
4208-as	GTGGCACAGTTTCGCGGTG	1	
4105-s	AACGCACCTCGAACTCCTCG	1	2531 Bp
4105-as	GCACTTCCACGCCAGC	1	
4068-s	GGAAACGCAGCTC (N/i) CG (R/i) TA (R/i) TA	45	2405 Bp
4068-as	TGTCCTGGTGCTCGCA (R/i) TA (R/i) TG	9	
4069-s	GCGCCGCTG (N/i) AG (N/i) CC (R/i) AT	75	1823 Bp
4069-as	GGAGAAGTC (Y/i) CGGGT (R/i) GT (N/i) AT	45	
4124-s	CAGTAGGCTTTGCCACCGTAGC	1	693 Bp
4124-as	CCGCTAGATTTGTCTCCGCTGT	1	

Tabelle 2.1 A, B: Verwendete Primersets. Aufgeführt ist die interne Primerbezeichnung sowie die Primersequenz in 5'-3'-Orientierung, der Degenerationsfaktor (Anzahl der durch Degenerationen vorkommenden Primervarianten) und die Größe des Amplifikats im humanen HCMV Genom (Stamm AD169). Degenerierte Basen wurden nach der Nomenklatur der International Union of Biochemistry and Molecular Biology angegeben: N = A/C/G/T; B = C/G/T; R = A/G; Y = C/T; i = Inosin. s = sense; as = antisense; Bp = Basenpaare.

2.1.7 Locked-nucleic-acid Oligonukleotide

Alle LNA-Oligonukleotide wurden vom Syntheselabor TIB Molbiol GmbH (Berlin, BRD) synthetisiert. Die Lieferung erfolgte in lyophilisierter Form, die Gebrauchslösung wurde mit Wasser auf 10 µM in Wasser eingestellt. Die LNA wurden in PCR mit Konzentrationen von 1 µM eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurden LNA dazu benutzt, spezifisch einzelne HCMV-Genotypen von der Amplifikation in der PCR auszuschließen. Der Genotyp, dessen Amplifikation spezifisch von einem LNA inhibiert werden soll, wird als Zielgenotyp beziehungsweise Zielsequenz bezeichnet. Die LNA wurden mit einer Aminogruppe (-NH₂) am 5'-Ende versehen, damit sie der DNA-Polymerase nicht als Primer dienen können. Tabelle 2.2 listet die verwendeten LNA mit ihren Sequenzen und Schmelztemperaturen auf. Es wurde vergleichend die T_m für Oligonukleotide mit und ohne substituierten LNA-Basen angegeben (siehe auch Abschnitt 2.2.6).

LNA-Name	RKI-LNA-Nr.	Ziel-Genotyp	LNA-Sequenz	Länge in Bp (LNA-Bp in Oligomer)	T _m LNA-Oligomer in °C	T _m DNA-Oligomer in °C	Δ T in °C
gB-1-LNA	21	gB-Typ-1	CCAAACCACCAGTG--NH ₂	14 (14)	87	50	37
gB-2-LNA	22	gB-Typ-2	CGAGTGACAATAATAC--NH ₂	16 (16)	80	45	35
gB-3-LNA	23	gB-Typ-3	CGACCACCCCTGT--NH ₂	12 (12)	86	49	37
gB-4-LNA	24	gB-Typ-4	CCGAGTCCATATTAG--NH ₂	15 (15)	85	45	40
UL33-1-LNA	26	UL33-Typ-1	TGTACCATTATGTATC--NH ₂	16 (16)	79	42	37
UL33-2-LNA	27	UL33-Typ-2	CCACTAAtGCCACtG--NH ₂	15 (13)	80	50	30
UL33-3-LNA	28	UL33-Typ-3	AATCATACCGTTCAAC--NH ₂	16 (16)	80	47	33

Tabelle 2.2: Verwendete Locked-nucleic-acid Oligonukleotide. Dargestellt ist die interne Oligonukleotidbezeichnung, der Zielgenotyp der LNA, die Sequenz in 5'-3'-Orientierung, die Anzahl der Basen und LNA-substituierten Basen und die Schmelztemperaturen der LNA-substituierten und nicht-substituierten Oligonukleotide. LNA-Nukleotide sind in Großbuchstaben, DNA-Oligonukleotide in Kleinbuchstaben dargestellt. Die Schmelztemperaturen wurden mittels <http://www.inatools.com> berechnet, bei einer Salzkonzentration von 62 mM und einer template- und LNA- Konzentration von 1 µM. ΔT zeigt den Schmelztemperaturunterschied zwischen LNA-substituierten und unsubstituierten Oligonukleotiden. NH₂ = Aminogruppe; T_m = Schmelztemperatur.

2.1.8 Biologisches Material

Die untersuchten humanen Blut- und Gewebeproben und Zelllinien stammten aus einem internen Bestand des RKI, der aus Einsendungen verschiedenen Ursprungs zusammengetragen wurde. Die aus diesem Bestand hier untersuchten Proben wurden zur Verfügung gestellt von: Dr. K.-A. Kreuzer, Universität Köln, D; A. Edubio und Dr. C. Kücherer, RKI, D; A. Birol, Kirikkale Universität, Türkei; Dr. R. Dolcetti Aviano, Italien sowie Dr. S. Voigt, RKI.

Für diese Arbeit wurden zudem verschiedene Proben von Herrn Dr. Hofmann vom Institut für

Material und Methoden

Virologie der Charité, Berlin, zur Verfügung gestellt. DNA-Extraktion und Primärtestung auf HCMV mit Quantifizierung erfolgte hierbei in der Charité. Die HCMV-Detektion erfolgte über Amplifikation des UL17-Gens von HCMV im Bereich von 206477 Bp bis 206606 Bp (HCMV Stamm AD169, Acc: BK000394) und Detektion per TaqMan-PCR. Die 95% Nachweisgrenze der Methodik liegt bei 750 Kopien/ml. Die aus dem Bestand des RKI untersuchten Tierproben wurden im Tai Nationalpark, Elfenbeinküste gesammelt und zur Verfügung gestellt von Dr. F. Leendertz. Weitere Tierproben stammen aus dem Deutschen Primatenzentrum, Göttingen, und wurden zur Verfügung gestellt von Dr. K. Mätz-Rensing.

Probe	Gewebeart	Herkunftsland
344	Vollblut	Deutschland
434	Vollblut	Nigeria
435	Vollblut	Nigeria
436	Vollblut	Nigeria
437	Vollblut	Nigeria
438	Vollblut	Nigeria
439	Vollblut	Nigeria
441	Vollblut	Nigeria
442	Vollblut	Nigeria
444	Vollblut	Nigeria
445	Vollblut	Nigeria
446	Vollblut	Nigeria
447	Vollblut	Nigeria
448	Vollblut	Nigeria
449	Vollblut	Nigeria
450	Vollblut	Nigeria
452	Vollblut	Nigeria
454	Vollblut	Nigeria
455	Vollblut	Nigeria
456	Vollblut	Nigeria
457	Vollblut	Nigeria
459	Vollblut	Nigeria
461	Vollblut	Nigeria
462	Vollblut	Nigeria
463	Vollblut	Nigeria
464	Vollblut	Nigeria
465	Vollblut	Nigeria
468	Vollblut	Nigeria
469	Vollblut	Nigeria
472	Vollblut	Nigeria
797	Knochenmark	Deutschland
798	Knochenmark	Deutschland
1502	Plasma	Deutschland

Tabelle 2.3 A: Humanproben von AIDS-Patienten. Alle Proben wurden von Edubio u. Kücherer, RKI zur Verfügung gestellt, außer: Proben 344, 797 und 798 Dr. Kreuzer, Universität Köln; Probe 1502 Dr. Hofmann, Charité.

Probe	Gewebeart	Herkunftsland
353	Vollblut	Deutschland
668	Knochenmark	Deutschland
766	Vollblut	Deutschland
767	Knochenmark	Deutschland
779	Lymphknotenbiopsie	Deutschland
780	Knochenmark	Deutschland
1292	Vollblut	Deutschland
1413	Vollblut	Deutschland
1486	Plasma	Deutschland
1487	Plasma	Deutschland
1488	Plasma	Deutschland
1489	Plasma	Deutschland
1490	Plasma	Deutschland
1491	Plasma	Deutschland
1492	Plasma	Deutschland
1493	Plasma	Deutschland
1494	Plasma	Deutschland
1495	Plasma	Deutschland
1496	Plasma	Deutschland

Tabelle 2.3 B: Humanproben von Patienten mit lymphoproliferativen Erkrankungen. Proben 353 bis 1292 wurden von Dr. Kreuzer, Universität Köln zur Verfügung gestellt; Probe 1413 von Dr. Voigt, RKI; Proben 1486 bis 1496 von Dr. Hofmann, Charité. Die Proben 1413 bis 1496 stammen von Kindern.

Probe	Gewebeart	Klinik	Herkunftsland
564	Hautbiopsie	unbekannt	Türkei
574	Hautbiopsie	unbekannt	Türkei
747	Mammabiopsie	Mammakarzinom	unbekannt
903	Vollblut	unklare Blutarmut	Deutschland
926	Zellkultur		Deutschland
927	Zellkultur		Deutschland
932	Zellkultur		Deutschland
933	Zellkultur		Deutschland
934	Zellkultur		Deutschland
1297	Vollblut	Normalbefund	Deutschland
1414	Vollblut	Nierentransplantatempfänger	Deutschland
1498	Plasma	Kombinierter Immundefekt	Deutschland
1505	Plasma	CMV-positive Schwangere	Deutschland

Tabelle 2.3 C: Weitere Humanproben und Zellkulturen. Proben 564 und 574 wurden von Dr. Birol, Kirikkale Universität zur Verfügung gestellt; Probe 747 von Dr. Dolcetti, Centro di Riferimento Oncologico; Proben 903 und 1297 von Dr. Kreuzer, Universität Köln; Proben 926 bis 934 sowie Proben 1414 und 1498 von Dr. Voigt, RKI; Probe 1505 von Dr. Hofmann, Charité.

Probe	Spezies	Gewebeart	Herkunftsland
Cgue1770	Colobus guereza	Blut	Elfenbeinküste
Cgue1857	Colobus guereza	Mucosa Mundhöhle	Elfenbeinküste
Msph2056	Mandrillus sphinx	Nierenbiopsie	Deutschland
Mfas2084	Macaca fascicularis	Nierenbiopsie	Deutschland
Ptro3147	Pan troglodytes	Milzbiopsie	Elfenbeinküste
Ptro4694	Pan troglodytes	Lungenbiopsie	Elfenbeinküste
Ptro4695	Pan troglodytes	Thymusbiopsie	Elfenbeinküste
Ggor5050	Gorilla gorilla	unbekannt	Elfenbeinküste

Tabelle 2.4: Tierische Untersuchungsproben. Alle Proben wurden von Dr. F. Leendertz, RKI zur Verfügung gestellt, außer Proben 2056 und 2084, von Dr. K Mätz-Rensing, Deutsches Primatenzentrum.

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Extraktion aus Gewebematerial und Lagerung

Die DNA-Extraktion aus Gewebematerial oder Blut erfolgte mit dem DNeasy Tissue Kit beziehungsweise dem DNeasy Blood Kit von Qiagen gemäß den Angaben des Herstellers. Hierbei erfolgt initial eine Zelllysis und ein Protein- und RNA-Verdau, anschließend die DNA-Bindung an Silica-Membranen der DNeasy-mini-Säulen, zwei Waschschrte folgen und abschließend die DNA-Elution in RNase- und DNase-freiem Wasser. Die extrahierte DNA wurde bei minus 20°C gelagert.

2.2.2 Konzentrationsbestimmungen

Die Konzentrationsbestimmungen von extrahierter Proben-DNA als auch von aufgereinigten PCR-Produkten erfolgten photometrisch am NanoDrop N-1000 Spectrophotometer. Vor einer Messung erfolgt initial eine Null-Kalibrierung des Gerätes auf das Elutionsmedium der DNA, bidestilliertes Wasser. Zur Messung hält das Gerät ein Volumen von 2 µl zwischen zwei Glasfaserkabeln und misst bei einer Wellenlänge von 230 nm die Absorption der Probe. Das Gerät errechnet aus der Absorption die DNA-Konzentration der Probe und zeigt sie in ng/µl an.

2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion

PCR ist ein molekularbiologisches Verfahren, bei dem *in vitro* selektiv DNA-Abschnitte amplifiziert werden. Es wurde 1986 von Mullis *et al.* entwickelt, und nutzt zur Amplifikation von DNA thermostabile DNA-Polymerasen.

Die Neusynthese von DNA-Sequenzen erfolgt mittels der DNA-Polymerase, dNTPs als Ausgangsmolekülen und zwei synthetischen Oligonukleotiden, den Primern. Durch Bindung der Primer an bekannte Sequenzbereiche außerhalb der zu amplifizierenden Region ermöglicht diese Methodik eine quasi exponentielle Synthese des mittleren Abschnitts. Ausgehend von geringsten Mengen DNA (< 10 Kopien pro PCR-Ansatz beziehungsweise 10^{-9} bis 10^{-15} g) können durch mehrmalige Wiederholung des Vorgangs in 20 bis 50 Zyklen solche Mengen des DNA-Amplifikats erzeugt werden, dass dieses über eine Agarose-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.2.7: Agarose-Gelelektrophorese) nachgewiesen und für andere experimentelle Zwecke benutzt werden kann.

Die PCR-Reaktion wird über Temperatur-Veränderungen gesteuert, die in Thermocyclern erfolgen. Ein PCR-Zyklus umfasst in der Regel drei verschiedene Temperaturschritte, die der PCR-Ansatz in einem Reaktionsgefäß erfährt. Der erste Schritt, die Denaturierung, findet bei über 90°C statt. Hierbei erfolgt die Auftrennung doppelsträngiger-DNA in Einzelstränge. Der erste Denaturierungsschritt ist mit 2 bis 12 Minuten von längerer Dauer, um die Denaturierung der DNA und die Aktivierung der Polymerase zu ermöglichen. Nachfolgend verlaufen alle Schritte bei gleicher Temperatur und Dauer. Der zweite Schritt eines Zyklus ist das Primerannealing, die Anlagerung der Primer an die Enden der Zielsequenz. Die Temperatur wird hier entsprechend der thermodynamischen Eigenschaften der Nukleotidzusammensetzung der Primer gewählt. Es stehen zwar exaktere Rechenmodelle zur Verfügung, doch näherungsweise kann die Annealingtemperatur eines Primers wie folgt bestimmt werden: Annealingtemperatur in °C = 4 x GC-Gehalt + 2 x AT-Gehalt. Nach Anlagerung der Primer erfolgt im dritten Schritt, der

Elongationsphase, die Synthese von DNA. Dies geschieht bei ca. 68 bis 72°C, je nach Temperaturoptimum der verwendeten Polymerase. Die DNA-Polymerase erzeugt ausgehend von dem 3'-Ende eines gebundenen Primers wieder einen DNA-Doppelstrang, wobei sich die Anzahl der DNA-Stränge verdoppelt. Die Elongationszeit wird entsprechend der Größe des zu amplifizierenden Zielsequenzabschnitts gewählt. Die nahezu exponentielle Amplifikation erfolgt bei diesem Verfahren aufgrund der bei nachfolgenden Zyklen als Matrize dienenden neu erzeugten DNA-Stränge.

Das von Mullis *et al.* etablierte Verfahren einer PCR wurde weiterentwickelt und PCR-Systeme für unterschiedliche Anforderungen entwickelt. Die Polymerase unterliegt einer veränderten Aktivität im Laufe der PCR. Das kostenintensive Enzym wird in der Regel nur in geringem Überschuss eingesetzt. Die Polymerase wird im Laufe der PCR thermal inaktiviert (Halbwertszeit bei 95°C: ca. 40 min). Zudem wird das Enzym während der PCR durch anfallende Verbindungen wie Pyrophosphate inhibiert. Erhöhte Konzentrationen der Polymerase im Ansatz können die Reaktionseffizienz verbessern und müssen experimentell validiert werden. Es stehen verschiedene thermostabile Polymerasen zur Verfügung, die sich z.B. durch unterschiedliche Fehlerraten, maximale Produktgrößen und Ausbeute unterscheiden. Nach Auswahl des Enzyms sollte der vom Hersteller für das Enzym optimierte PCR-Puffer eingesetzt werden. Eine zusätzliche Gabe von MgCl₂ (wenn nicht schon ausreichend im PCR-Puffer vorhanden) zu dem PCR-Ansatz kann durch Interaktion von MgCl₂ mit dNTPs und Matrizen-DNA die Fehlerrate der Polymerase senken und die Reaktion durch spezifischere Primeranlagerung verbessern. Andere Zusätze zum PCR-Ansatz können je nach Zielsetzung oder Problemen positive Einwirkungen auf die Amplifikation haben. In der vorliegenden Arbeit wurde DMSO in ca. 2 bis 5% zugesetzt. DMSO wirkt sich positiv auf Strangtrennung und Amplifikationseffizienz von GC-reichen Sequenzen aus. Zur Etablierung eines PCR-Systems müssen neben Auswahl und Anpassung der Zusammensetzung des PCR-Ansatzes auch die Bedingungen des Thermocycling angepasst und ggf. optimiert werden.

2.2.4 Nested-PCR

Eine nested-PCR (engl., etwa: „verschachtelte“ PCR) ist ein PCR-System unter Verwendung von zwei Primerpaaren, einem äußeren Primerpaar und einem inneren Primerpaar. Zur Amplifikation von Proben-DNA wird dazu eine PCR mit dem äußeren Primerpaar durchgeführt. Anschließend werden 1-2 µl des ersten Ansatzes in den zweiten Ansatz mit dem inneren Primerpaar übertragen und ebenfalls zur Reaktion in den Thermocycler gegeben.

Ein wesentlicher Vorteil der nested-PCR ist die erhöhte Sensitivität. Durch die zwei konsekutiv erfolgenden PCR können auch kleinste Ausgangsmengen DNA auf eine detektierbare Menge amplifiziert werden. Ein weiterer Vorteil ist die erhöhte Spezifität der nested-PCR. Durch Verwendung von insgesamt vier Primern mit jeweiliger Bindung an spezifische Sequenzabschnitte der Zielsequenz kann die Menge von amplifizierten Nebenprodukten entscheidend gesenkt werden.

Allgemein sind PCR, auch nested-PCR, in ihrer Reaktionseffizienz limitiert, d.h. dass obwohl eine detektierbare Amplifikation ausgehend von einem DNA-Strang vorkommen kann, dies *in vitro* jedoch nicht eintritt. Auch bei einer bezüglich Primerauswahl und Reaktionsbedingungen optimierten PCR ist die Reaktionseffizienz in den ersten 20 PCR-Zyklen nahezu maximal, nimmt aber im Laufe der PCR ab. Dies tritt abhängig von Länge und Basenfolge der Zielsequenz ein, beispielsweise durch Sekundärstrukturen der Matrize, die die Reaktionseffizienz der PCR vermindern. Andererseits verändert sich im Lauf der PCR die molekulare Zusammensetzung des PCR-Ansatzes immer weiter: Die Zunahme der Matrize spielt eine entscheidende Rolle bei der Senkung der Reaktionseffizienz. Vor allem bei nested-PCR können bei hoher Kopienzahl der Matrize sehr hohe Kopienzahlen des Amplifikats im Ansatz auftreten, welche dann mit den Primern um die Reassoziierung mit den Einzelsträngen kompetitieren. Zudem kann die Matrizen-DNA mit anderen in der Probe vorkommenden Genbereichen hybridisieren und ungewollte Produkte primen. So kann es bei dem Design von nested-PCR sinnvoll sein, die Anzahl der Zyklen auf etwa 20 zu verringern, um starke Artefakte zu verhindern (Roux, 1995). Hierunter leidet dann die Sensitivität des PCR-Systems, so dass die optimale Zyklenzahl in Abhängigkeit von Sensitivität und Artefakten experimentell ermittelt werden muss. Vor allem niedermolekulare Signale mit unsauberen Auftrennungen der Zielbanden in der Gelelektrophorese sind ein häufiges Problem von nested-PCR (Roux, 1995).

Zur Minimierung von Kontaminationen erfolgten alle Pipettierschritte der PCR in PCR-Sterilboxen, wobei das Ansetzen des Mastermixes und die Zugabe der Proben-DNA in getrennten Räumen stattfanden. In einem weiteren Laborbereich fand die Übertragung von der ersten zur zweiten Runde einer nested-PCR statt. Die Auswertung anhand von Agarose-Gelelektrophoresen und Sequenzierungen wurde in einem dritten, distinkten Laborbereich vollzogen. Sterilboxen und Arbeitsmaterialien wurden nach jeder Benutzung chemisch und über Ultraviolettstrahlung dekontaminiert.

2.2.5 Thermocycling mit degenerierten Primern zur Detektion unbekannter Sequenzvarianten

Es wurden zur Detektion unbekannter gB und UL33-Genotypen von HCMV degenerierte und inosierte Primer eingesetzt. Die Primersequenzen wurden von AD169 beziehungsweise Merlin abgeleitet. Vor allem der 3'-Bereich, im Optimalfall aber der ganze Primer sollte an einen stark konservierten Genbereich der Zielsequenz binden. Bei abweichenden Zielsequenzen im Primerbereich wurde die Position des Primers so gewählt, dass bei Unterschieden zwischen den einzelnen Virusgenomen nur die jeweilig dritte Base eines Triplets (die sogenannte wobble-Position) des Primers betroffen war. An dieser Position konnte der Primer, je nach den im alignment vorkommenden Basen, degeneriert werden. Ein degenerierter Primer ist ein Primergemisch, welches sich pro degenerierter Position aus maximal 5 Primervarianten (alle vier verschiedenen Basen plus Inosin) zusammensetzt. Mögliche Sequenzabschnitte wurden auf ihre Eignung als Primerbindungsstelle mit Primer Premier 5.0 überprüft.

Beim Einsatz der Primer erhöht eine niedrige Annealingtemperatur in der PCR das Spektrum an Hybridisierungsmöglichkeiten der Primer. Die optimale Annealingtemperatur wurde für die Primer mehrfach experimentell mit Temperaturgradienten untersucht. Zudem wurden mehrere etablierte Protokollvarianten zur Einstellung der Thermocycler auf ihre Eignung für die nested-PCR-Systeme getestet. Hierbei existiert ein etabliertes „Standard-Protokoll“, für die Anwendung einer Taq-Polymerase und eines T Gradient Thermocycler zur Amplifikation von herpesviraler DNA. Die Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 2.5 dargestellt. Des Weiteren wurde ein „ramp-time-Protokoll“ etabliert, um bei hoher Sensitivität ein breiteres Detektionsspektrum in der PCR zu ermöglichen (Tabelle 2.6; Nezlisah Yasmun, Diplomarbeit, unveröffentlicht). Im Gegensatz zum „Standard-Protokoll“ weist das „ramp-time-Protokoll“ eine verzögerte Aktivierung des Enzyms auf, wofür der initiale Aktivierungsschritt von 12 auf 2 min. reduziert wurde. Die vollständige Aktivierung erfolgt im Lauf der PCR während der einzelnen Denaturierungsschritte. Zudem wurde die Zyklenzahl kompensatorisch von 40 auf 50 Zyklen erhöht. Die Zeit des Temperaturwechsels zwischen dem Annealing- und Elongationsschritt wird als ramp-time bezeichnet. Eine im Gegensatz zum „Standard-Protokoll“ (5°C/sec) verringerte ramp-time von 0,09°C/sec erlaubt während der Primerbindung Falschpaarungen und setzt die Spezifität des „ramp-time-Protokolls“ herab. Sowohl für das „ramp-time-Protokoll“ als auch für das „Standard-Protokoll“ wurden in den einzelnen PCR-Ansätzen dNTPs bei 200 µM, AmpliTaqGold-Polymerasen-Puffer 1x, MgCl₂ bei 2 mM, DMSO mit 2 bis 5 %, AmpliTaq Gold DNA Polymerase mit 2 units sowie sens- und antisense-Primer jeweils in einer Konzentration von 1

μM eingesetzt. Ausgehend von den genannten Zusammensetzungen der PCR-Ansätze und den in Tabellen 2.5 und 2.6 dargestellten Reaktionsbedingungen für die Thermocycler kann eine PCR nachfolgend weiter optimiert werden. Hierzu werden mehrere PCR in einem Experiment durchgeführt, wobei in einzelnen PCR-Ansätzen jeweils ein Parameter der PCR verändert wird. Im Vergleich zum unveränderten PCR-Ansatz des abgelaufenen Experiments können dann die optimalen Parameter für ein PCR-System ermittelt werden.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	12 min	1x
Denaturierung	95°C	20 sec	
Primerannealing	X°C	30 sec	45x
Elongation	72°C	Y min	
Finale Elongation	72°C	10 min	1x

Tabelle 2.5: Reaktionsbedingungen des „Standard-PCR-Protokolls“

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	2 min	1x
Denaturierung	95°C	30 sec	
Primerannealing	X°C	30 sec	50x
Elongation	72°C	Y min	
Finale Elongation	72°C	10 min	1x

ramp-time 0,09 °C/min

Tabelle 2.6: Reaktionsbedingungen des „ramp-time-PCR-Protokolls“

2.2.6 Antisense locked-nucleic-acid Oligonukleotide für PCR

Locked-nucleic-acids (2'-O,4'-C-methylene-Ribonukleotide) sind Nukleinsäure-Analoga und wurden erstmals von Singh *et al.* (1998) synthetisiert. Diese RNA-Derivate besitzen eine Methylenbrücke zwischen dem 2'-Sauerstoff und dem 4'-Kohlenstoff der Ribose. Ribose, wie sie in Nukleinsäuren vorkommt, kann dank der Drehbarkeit der kovalenten Bindungen im Kohlenstoffgerüst zwei verschiedene räumliche Konformationen annehmen. Die zusätzlich eingebrachte Methylenbrücke arretiert (engl. „locked“) die Ribose in der 3'-endo-Konformation. Die Struktur und Konformation einer LNA im Vergleich zu einer DNA ist in Abbildung 2.2 dargestellt.

Material und Methoden

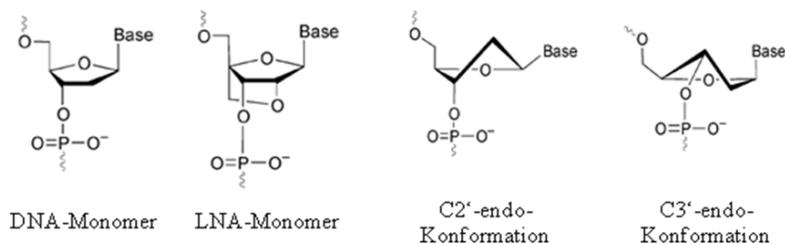


Abbildung 2.2: Struktur und Konfiguration von LNA- und DNA-Monomeren. DNA kann in zwei verschiedenen Konformationen vorkommen, den energieärmeren 2'-Endo-Konformation und den energiereicheren 3'-Endo-Konformation. Die LNA weist im Gegensatz zur DNA eine zusätzliche Methylenbrücke in der Ribose auf, welche eine 2'-endo-Konformation (S-Typ-Zucker) der Ribose verhindert. Somit sind LNA-Moleküle in der energiereicheren 3'-endo-Konformation fixiert (N-Typ-Zucker) (Aus Jensen *et al.*, 2001).

Oligonukleotide der 3'-endo-Konformation nehmen die A-Typ-Helix an, wobei Oligonukleotide der 2'-endo-Konformation die B-Typ-Helix aufweisen (Jensen *et al.*, 2001). A-Typ-Helices sind kompakter angeordnet als B-Typ-Helices, so dass zwischen komplementären Basen vermehrt Interaktionen möglich sind.

Aufgrund dieser Konformationsänderungen lässt sich eine gesteigerte Affinität und Spezifität von LNA gegenüber DNA und RNA beobachten (Jensen *et al.*, 2001). In thermischen Untersuchungen der Denaturierung von LNA-DNA-Duplexen konnte die hohe Affinität von LNA zu ihren komplementären DNA- oder RNA-Basen quantifiziert werden. Es besteht eine abnehmende Stabilität der Bindungen von LNA-LNA, LNA-DNA zu DNA-DNA Interaktionen. Die Steigerung der T_m von Basen-Bindungen bei LNA-Substitution eines Nucleotids wurde unter anderem von You *et al.* (2006) überprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2.7 dargestellt.

Basenpaar	DNA-DNA-Basenpaar- T_m	LNA-DNA-Basenpaar- T_m	ΔT_m
A-T	59,4°C	67,5°C	8,1°C
T-A	60,5°C	67,1°C	6,6°C
C-G	61,8°C	69,5°C	7,7°C
G-C	63,9°C	71,4°C	7,5°C

Tabelle 2.7: Schmelztemperaturunterschiede von DNA-DNA- und LNA-DNA-Basenpaaren. T_m = Schmelztemperatur (Nach You *et al.*, 2006).

LNA-Basen sorgen für eine verbesserte mismatch-Diskriminierung von Oligonukleotiden. Dies ist eine wichtige Eigenschaft von LNA für die Verwendung als antisense-Oligonukleotide bei der selektiven Amplifikation einzelner viraler Genotypen. You *et al.* (2006) untersuchten die Basenfehlpaarungs-Diskriminierung von einzelnen LNA-Basen. Die thermodynamischen Auswirkungen einer Basenfehlpaarung wurden über die Differenz des Schmelzpunktes von

Fehlpaarung zu nicht-Fehlpaarung als sogenannte Basenfehlpaarungs-Diskriminierungs-Schmelztemperaturdifferenz ($\Delta_{\text{md}} T_m$) quantifiziert, wobei höhere $\Delta_{\text{md}} T_m$ -Werte einer besseren Diskriminierung entsprechen. Diese errechnet sich aus den T_m der beiden möglichen komplementären Interaktionen für die an Basenfehlpaarungen beteiligten Basen und der ermittelten T_m der Basenfehlpaarung. Die Formel zur Bestimmung der $\Delta_{\text{md}} T_m$ ist exemplarisch für das Basenfehlpaarung A⊗C in Abbildung 2.3 dargestellt. Eine hohe $\Delta_{\text{md}} T_m$ liegt bei Fehlpaarungen von C⊗C, C⊗A, C⊗T und T⊗C. Eine geringere $\Delta_{\text{md}} T_m$ von einer LNA-DNA-Basenfehlpaarung im Vergleich zu einer DNA-DNA-Basenfehlpaarung kommt nur bei der Fehlpaarung G⊗T vor.

$$\Delta_{\text{md}} T_m (A \otimes C) = \frac{T_m (A-T) + T_m (C-G)}{2} - T_m (A \otimes C)$$

Abbildung 2.3: Definition der Basenfehlpaarungs-Diskriminierungs-Schmelztemperaturdifferenz ($\Delta_{\text{md}} T_m$)
Für eine Fehlpaarung von A⊗C stellt sich die $\Delta_{\text{md}} T_m$ als Mittelwert der T_m der beiden möglichen komplementären Interaktionen für die an der Fehlpaarung beteiligten Basen abzüglich der T_m der Fehlpaarung dar (You *et al.*, 2005).

2004 wurde erstmals ein reines-LNA-Oligonukleotid mittels Kernresonanzspektroskopie auf seine Struktur untersucht (Nielsen *et al.*, 2004). Zusätzlich wurde ein reines-LNA-Oligonukleotid-RNA-Oligonukleotid-Duplex analysiert. Das Duplex stellt sich als A-Typ-Helix dar, die Achse der Helix ist fast gerade. Die Duplexbildung ist regulär, ähnlich der von DNA-RNA-Duplexen. Im Vergleich zu nur teilsubstituierten LNA-DNA-Oligonukleotiden zeigen reine LNA derselben Sequenz den höchsten Schmelzpunkt. Untersuchungen zeigten die Funktionalität komplett LNA-substituierter Oligonukleotide, und You *et al.* (2006) stellten bei sechs der zwölf möglichen Basenfehlpaarungs-Kombinationen die höchste $\Delta_{\text{md}} T_m$ bei komplett LNA-substituierten Tripletts im Vergleich zu LNA-DNA chimären Tripletts fest. Für DNA-LNA-Chimären Oligonukleotiden gibt es verschiedene Meinungen wie eine gute Fehlpaarungs-Diskriminierung eines Oligonukleotids zu gewährleisten ist. In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirksamkeit der Basenfehlpaarungs-Diskriminierung von komplett LNA-substituierten Oligonukleotiden überprüft. Lediglich die von You *et al.* identifizierte Fehlpaarung G⊗T, bei dem die $\Delta_{\text{md}} T_m$ eines LNA-DNA-Duplexes schlechter als die eines DNA-DNA-Duplexes ist, würde sinnvoller Weise nicht substituiert werden. Bei dem Oligonukleotid UL33-2-LNA wurde nach der rechnerischen T_m von über 80°C davon abgesehen, zwei weitere DNA-Thyminbasen mit LNA zu substituieren.

Zur Auswahl der optimalen Position der LNA wurden für alle zu unterscheidenden HCVM-Genotypen jeweils Konsensussequenzen erzeugt. Diese beinhalteten alle in der GenBank

abgelegten Sequenzen des entsprechenden HCMV-Genotyps als auch alle zu dem Zeitpunkt der Synthese vorliegenden eigenen Sequenzen. In einem alignment der verschiedenen Konsensussequenzen konnten dann geeignete Sequenzabschnitte zur Positionierung eines antisense-Oligonukleotids ausgewählt werden. Überprüfungen von möglichen Sekundärstrukturen erfolgten auf der Seite <http://www.lnatoools.com> nach Berechnungen der Version 2.1 der von Exiqon bereitgestellten Software (Tolstrup, 2003).

2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese

DNA besitzt aufgrund der am Zuckergerüst vorkommenden Phosphatgruppen eine negative Ladung. Dies ermöglicht die Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Elektrophorese. Hierbei geschieht die größenabhängige Auftrennung durch Elektrophorese in einem Agarosegel. Agarose ist ein Polysaccharid, welches in verschiedenen Konzentrationen zwischen 0,7% (für größere Fragmente) bis 2% (für kleinere Fragmente) eingesetzt werden kann. Die Lösung der Agarose erfolgt in 0,5 x TBE Puffer. 50 ml Agarose wurden 2,5 µl GelRed zugesetzt. 5 µl des PCR-Produkts wurden mit 2 µl DNA-Probenpuffer versetzt. Die Auftragung auf Gel fand mit einer Pipette statt, wobei bei Amplifikaten des gB-Gens meist 100Bp ladder und bei Amplifikaten des UL33-Gens meist Lambda *BstEII* verwendet wurde (jeweils 300 ng). Nach der Auftrennung bei einer Spannung von ca. 6 bis 10 Volt/cm konnten die DNA-Banden durch das fluoreszierenden GelRed mittels UV-Licht der Wellenlänge von 314 nm sichtbar gemacht werden. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe eines Transilluminators, Videokamera und Videoprinter (Intas UV-System).

2.2.8 Aufreinigung von PCR-Produkten

Für die Aufreinigung von PCR-Produkten wurden zwei verschiedene Kits benutzt, zum einen Invisorb Spin PCRapid, zum anderen QIAquick PCR Purification. Sie wurde gemäß den Angaben der Hersteller durchgeführt. Beide Kits ermöglichen eine Aufreinigung von PCR-Produkten über die Bindung von DNA an Silica-Membranen bei hohen Salzkonzentrationen. Nach DNA-Bindung werden Enzyme, freie Nukleotide und kleine Oligonukleotide durch einen Waschschriff mit Alkohol entfernt und die gebundene DNA anschließend mit bidestillierten Wasser eluiert.

Beispielrechnung:

Ein aufgereinigtes PCR-Amplifikat von 1000 Bp zeigt photometrisch eine DNA-Konzentration von 20 ng/μl. Wie viele Kopien/μl liegen vor?

Die Umrechnung für doppelsträngige DNA von μg in pmol erfolgt über:

$$\text{Stoffmenge}_{ds_DNA} [pmol] = \frac{\text{Masse}_{ds_DNA} [\mu g] * 1515}{\text{Länge}_{ds_DNA} [Bp]}$$

So enthält 1 μg doppelsträngiger DNA einer Länge von 1000 Bp:

$$\text{Stoffmenge}_{ds_DNA} [pmol] = \frac{1[\mu g] * 1515}{1000 [Bp]} = 1,52 [pmol]$$

1 μg doppelsträngiger DNA enthält folglich eine Kopienzahl von:

$$\text{Kopienzahl}_{pro_μgDNA} = 6,022 * 10^{11} \frac{[Kopien]}{[pmol]} * 1,52 \frac{[pmol]}{[\mu g]} = 9,15 * 10^{11} \frac{[Kopien]}{[\mu g]}$$

Dies ergibt für eine die gemessenen Konzentration von 20 ng/μl eine Kopienzahl pro μl DNA von:

$$\text{Kopienzahl}_{pro_μlDNA} = 9,15 * 10^{11} \frac{[Kopien]}{[\mu g]} * 0,020 \frac{[\mu g]}{[\mu l]} = 1,83 * 10^{10} \frac{[Kopien]}{[\mu l]}$$

Avogadro Konstante: $N_A = 6,022 * 10^{23} \frac{[Teilchen(bzw.Kopien)]}{[mol]} = 6,022 * 10^{11} \frac{[Kopien]}{[pmol]}$

2.2.9 Kopienzahlberechnung

Die Konzentration einer DNA-Probe kann photometrisch bestimmt werden. Bei einer definierten Basenpaarlänge, wie bei DNA-Amplifikaten, kann die in Kopienzahl/μl in einer Probe errechnet werden (siehe Beispielrechnung).

2.2.10 Sequenzierung

Die Typisierung der mittels PCR amplifizierten Gene erfolgte durch Sequenzierung. Das in dieser Arbeit angewendete BigDye-Terminator3.1-Cycle-Sequencing-Kit beruht auf der Didesoxymethode nach Sanger *et al.* (1977). Hierbei werden, analog zur PCR, durch Enzyme zu der zu sequenzierenden Sequenz komplementäre Stränge erzeugt. Neben Sequenzierungsprimern und den vier dNTPs kommen jedoch auch 2'- 3'-Didesoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTP) im Ansatz vor. Diese werden analog zu dNTP in den neu synthetisierten Strang eingebaut, jedoch kommt es durch das Fehlen der Hydroxylgruppe am 3'-Kohlenstoffatom zu einem Kettenabbruch. So entstehen während des Thermocycling Fragmente unterschiedlicher Länge,

die jeweils am 3'-Ende eines der vier ddNTP tragen, welche zudem mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert sind. Die Erfassung der Sequenz erfolgt dann durch Detektion der Fragmentlänge und der entsprechenden Farbfluoreszenz in der Kapillarelektrophorese des ABI PRISM 3100 Sequenziergeräts. Das Ergebnis wird als Computerdatei ausgegeben.

Ein Sequenzierungsansatz enthielt bei einem Gesamtvolumen von 10 µl 1,5µl Sequenzierungspuffer (5x ABI), 0,7 µl Primer und 1 µl BigDye3.1. Es wurden ca. 30 bis 40 ng DNA je Ansatz eingesetzt. Die Sequenzierungsreaktion erfolgte in einem Thermocycler unter den in Tabelle 2.8 dargestellten Reaktionsbedingungen, wobei die Annealingtemperatur je nach Primer gewählt wurde, bei degenerierten Primern lag die Annealingtemperatur stets bei 55°C.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	96°C	2 min 5 sec	1x
Denaturierung	96°C	10 sec	
Primerannealing	X°C	5 sec	25x
Elongation	60°C	4 min	

Tabelle 2.8: Reaktionsbedingungen für Sequenzierungs-PCR

2.2.11 Bearbeitung der Sequenz-Rohdaten

Die Rohdaten wurden mit dem ABI PRISM Genetic Analyzer Sequenziergerät erstellt und informatisch ausgewertet. Hierzu wurden mit dem Programm SeqMan aus der Lasergene DNA-Suite 6 die Einzelsequenzen auf ihre verwertbaren Bereiche untersucht und auf Lesbarkeit und Fehler überprüft. Unlesbare Enden der Einzelsequenzierungen wurden automatisch getrimmt und manuell etwaige Primersequenzen entfernt. Die Einzelsequenzierungen wurden von SeqMan anhand von assemblies aneinander ausgerichtet bis die Einzelsequenzierungen korrekt überlappen und ein durchgängiges Sequenzprodukt entsteht, das contig, die Konsensussequenz der Einzelsequenzierungen (unter Verwendung der default-Einstellungen: minimum match size 12 Bp, minimum match percentage 80%). Bisher unbekannte Sequenzen von Genotypen wurden mit mindestens zwei Sequenzierungen je Abschnitt von jeweils zwei unabhängigen PCR-Läufen validiert. Die einzelnen contigs wurden aus SeqMan exportiert und im Programm MacVector weiter analysiert.

2.2.12 Phylogenetische Analyse

Es stehen verschiedene Methoden zur phylogenetischen Analyse von Sequenzdaten zur

Verfügung. Die Abschätzung von phylogenetischen Zusammenhängen kann über die maximale Wahrscheinlichkeit nach der Maximum-Likelihood-Methode erfolgen. Ein Modell mit dieser Methode wurde erstmals von Cavalli-Sforza *et al.* (1967) vorgestellt, Vergleiche mit neueren Methoden zeigten überwiegend eine Überlegenheit diese Methode gegenüber anderen (Huelsenbeck, 1995). Jedoch erfordert diese Methode einen sehr hohen Rechenaufwand, neuere Methoden wie die Neighbour-Joining-Methode von Saitou *et al.* (1987) zeigen bei wesentlich geringerer Rechendauer vergleichbare Ergebnisse und werden vielfach angewandt (Huelsenbeck, 1995; Tateno *et al.* 1994). Sowohl die Ergebnisinterpretation im Verlauf der Arbeit als auch die in dieser Arbeit dargestellten phylogenetischen Stammbäume wurden mit der Neighbour-Joining-Methode erzeugt.

Die erzeugten Sequenzen der einzelnen Genotypen aus gB und UL33 wurden mit dem Programm MacVector ausgewertet. Hierzu wurden alignments auf Nukleinsäureebene und Aminosäureebene erstellt und auf Basis letzterer in MacVector Stammbaum-Berechnungen angefertigt. Als Methode wurde die Neighbour-Joining-Methode angewandt, die weiteren Einstellungen waren „Best Tree Modus“, zufällige Baumverzweigungen, ignorieren aller Sequenzlücken, Darstellung mittels „midpoint rooting“ beziehungsweise „outgroup rooting“. In den Stammbaumdarstellungen stellt die Länge der horizontalen Äste den Verwandtschaftsgrad dar.

3. Ergebnisse

3.1 Polymerase-Kettenreaktion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung einer Methodik zur Genotypisierung von HCMV in zwei Genbereichen (UL55 und UL33). Zur Amplifikation der Genbereiche sollte jeweils eine nested-PCR mit degenerierten Primern entwickelt werden, welche nach DNA-Extraktion aus dem Probenmaterial auch divergente Genotypen mit hoher Sensitivität und Spezifität darstellen kann. Um die Vielseitigkeit bei der Detektion von divergenten HCMV-Genotypen zu überprüfen, sollten die PCR-Systeme auch an verschiedenen CMV von nicht-humanen Primaten eingesetzt werden.

Humanproben können mehrere verschiedene HCMV enthalten, die sich in einzelnen Genen unterscheiden. Um bei solchen Mehrfachinfektionen alle vorkommenden UL55- und UL33-Genotypen amplifizieren zu können, sollten in den PCR zusätzlich LNA eingesetzt werden. Diese antisense-Oligonukleotide sollten in einzelnen PCR spezifisch die Amplifikation der schon bekannten Genotypen unterdrücken und die Amplifikation weiterer Genotypen eines Genbereichs aus einer Probe ermöglichen.

Die Eignung von LNA für diesen Zweck sollte in Modellversuchen für beide Genbereiche systematisch evaluiert und abschließend eine Gruppe von Humanproben auf alle vorkommenden UL55 und UL33-Genotypen untersucht werden.

3.1.1 Primergenerierung

Zur Auswahl der Primer wurden alignments der entsprechenden Genbereiche mit MacVector erstellt. Hierbei wurden neben Sequenzen von HCMV aus der GenBank auch CMV-Sequenzen von anderen Wirten mit einbezogen, sowie ein entfernteres Mitglied der Betaherpes-Familie (Tupaia Herpesvirus 1), um konservierte Genabschnitte zu identifizieren. Konservierte Genabschnitte sind mehr oder weniger identische Sequenzbereiche desselben Gens in den Genomen verschiedener Viren, weshalb diese Bereiche sich für die Positionierung von universellen Primersystemen eignen. Jedoch kommen in variablen Genen häufig keine vollständig konservierten Sequenzabschnitte vor, weshalb hierfür degenerierte Primer eingesetzt werden müssen. Dies war sowohl für den Genbereich UL55 als auch für UL33 notwendig.

3.1.2 Degenerierte Primer für das gB-Gen

Eingangs wurde überprüft, ob bereits ein nach den oben genannten Kriterien geeignetes Primersystem zur Amplifikation der gB-cleavage-site besteht. Exemplarisch ist in den Abbildungen 3.1 A und B ein alignment mit den in Studien vielgenutzten Primern 1319-s und 1604-as nach Chou *et al.* dargestellt. Die Sequenzen der Primer sind in der ersten Zeile des alignments gezeigt, in den folgenden Zeilen sind CMV-Gensequenzen der GenBank aufgeführt, die Basenfehlpaarungen zu den Primern aufweisen. Der sense Primer 1319 zeigt eine relevante Basenfehlpaarung der dritten Primerbase mit gB-Typ 5. Shepp *et al.* verwendeten einen veränderten sense Primer für die Amplifikation des gB-Typ 5. Zudem zeigen sich im mittleren und im 5'-Bereich verschiedene Basenfehlpaarungen zu den gB-Genotypen eins, zwei und vier. Die Einbeziehung mehrerer gB-Sequenzen von CMV von Schimpansen, Rhesusaffen, Mäusen und Tupaia Herpesvirus 1 ermöglichte es, konservierte Genabschnitte der Primerbindungssequenz zu identifizieren. Hierbei fällt auf, dass der undegenerierte antisense Primer 1604 mit der dritten Primerbase eine Basenfehlpaarung zu Schimpansen-CMV zeigt.

Für die in dieser Arbeit entwickelten Primer sind exemplarisch die äußeren Primer der nested-PCR in alignments dargestellt (Abb. 3.1 C und D). Die Primer befinden sich auf konservierten Sequenzabschnitten wie im Vergleich mit CMV anderen Wirtsspezies ersichtlich. Alle Basenfehlpaarungen, die trotz Degeneration der Primer mit in der GenBank abgelegten Genotypen vorkommen, sind aufgeführt. Für den äußeren sense Primer 4007-s (Abb. 3.1 C) besteht an der siebten Primerbase eine Basenfehlpaarungen mit dem Tupaia Herpesvirus 1, an der elften Primerbase eine Basenfehlpaarung mit AD169. Antisense Primer 4007-as zeigt ab der zehnten Primerbase Basenfehlpaarungen zu nicht-humanen CMV, bei humanen CMV ist keine Sequenz mit Basenfehlpaarungen zur Primersequenz publiziert beziehungsweise sequenziert worden.

Es wurden zwei alternativ einsetzbare innere Primerpaare (4008-s & 4008-as sowie 4125-s & 4125-as) etabliert. Die äußeren Primer 4007-s und -as amplifizieren ca. 800 Bp. Das Amplifikat von 4125-s & 4125-as ist mit 554 Bp größer als das Amplifikat von 4008-s & 4008-as (483 Bp), dies hat einen etwas größeren Sequenzinformationsgewinn nach der Sequenzierung zur Folge. Beide innere Primer amplifizieren den cleavage-site Bereich von gB, in Abbildung 3.2 ist dies für 4125-s & 4125-as schematisch dargestellt.

Ergebnisse

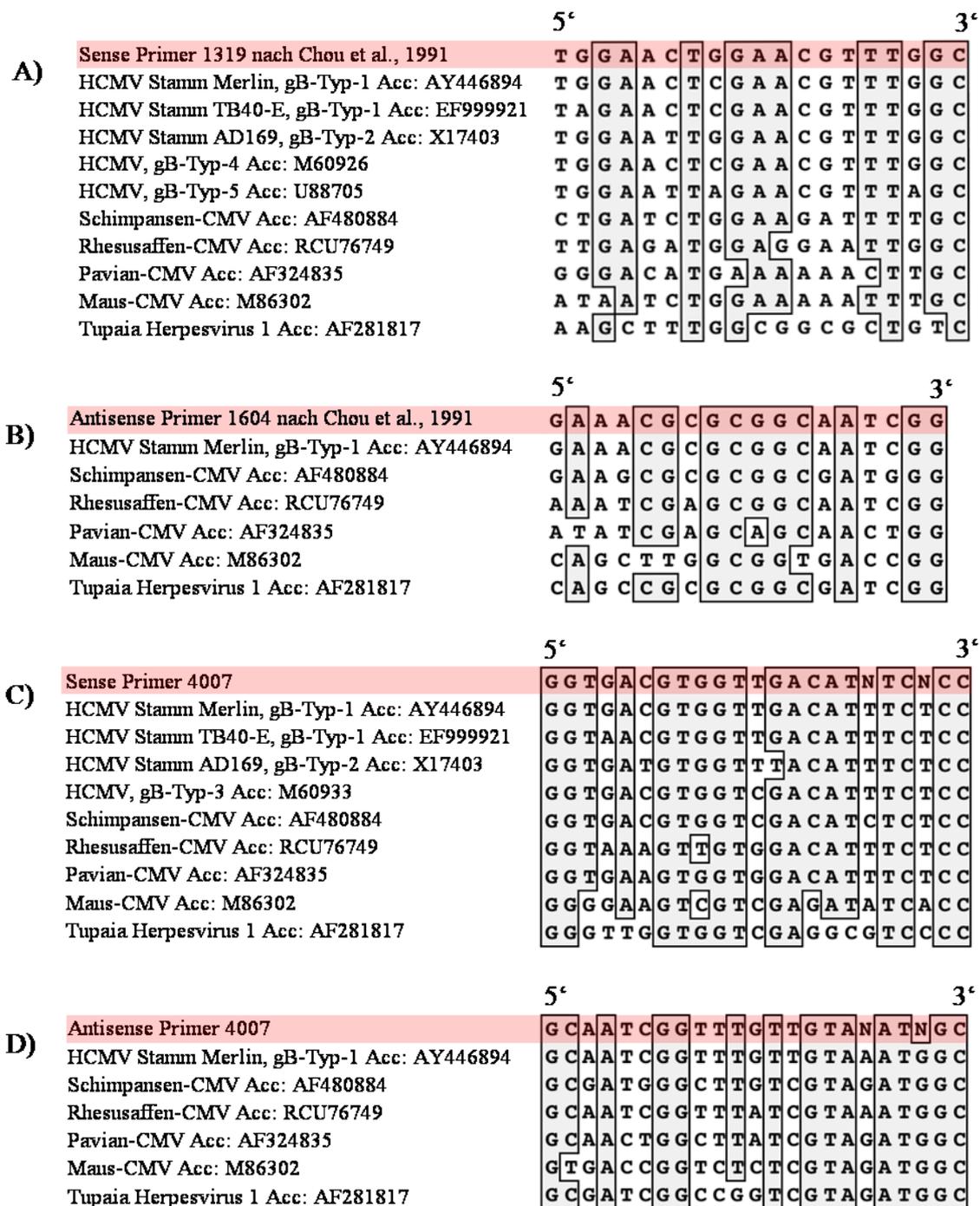


Abbildung 3.1 A-D: Primer zur Amplifikation der cleavage-site von gB. Alignments von Primern für die cleavage-site von gB mit gB-Sequenzen verschiedener humaner und nichthumaner CMV, die Basenfehlpaarungen zu den jeweiligen Primerbindungsabschnitten aufweisen. A und B: Sense Primer 1319-s und antisense Primer 1604-s nach Chou *et al.* (1991). Abbildungen C und D zeigen alignments der in dieser Arbeit entwickelten äußeren Primer. alignments wurden mit Mac Vector 9.5 erzeugt, Schattierung erfolgt bei einem threshold von 80%. Acc = accession number.

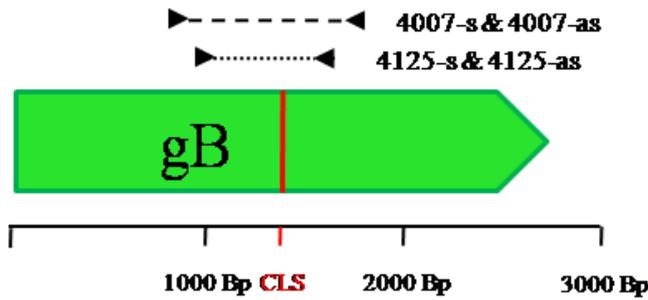


Abbildung 3.2: Darstellung des Glykoprotein B Gens mit den Positionen der äußeren und inneren Primer der nested-PCR. Die Position der cleavage-site (CLS) ist rot dargestellt.

3.1.3 Degenerierte Primer für das UL33-Gen

Als Primerbindungsstellen zur Amplifikation des variablen Gens UL33 wurden konservierte Bereiche der relativ invariablen Gene UL32 und UL34 ausgewählt. UL32 kodiert ein Tegument-Protein und ist essentiell für die Proliferation von HCMV *in vitro* (Dunn *et al.*, 2003). UL34 kodiert einen Transskriptionsfaktor für das US3-Gen und ist ebenfalls essentiell für die Proliferation von HCMV *in vitro* (Dunn *et al.*, 2003). Die Anordnung der Gene UL32, 33 und 34 und des in dieser Arbeit entwickelten Primersystems ist in Abbildung 3.3 dargestellt.

Initial wurden die gesamten in der GenBank verfügbaren Sequenzen für UL32 und UL34 in alignments zusammengefasst, unter Einbeziehung von CMV-Sequenzen anderer Wirte. Geeignete konservierte Sequenzabschnitte für Primer wurden ausgewählt und auf ihre Eignung überprüft. Das Amplifikat der äußeren Primer (4068-s & 4068-as) hat eine Größe von ca. 2400 Bp, das der inneren Primer (4069-s & 4069-as) ca. 1820 Bp.

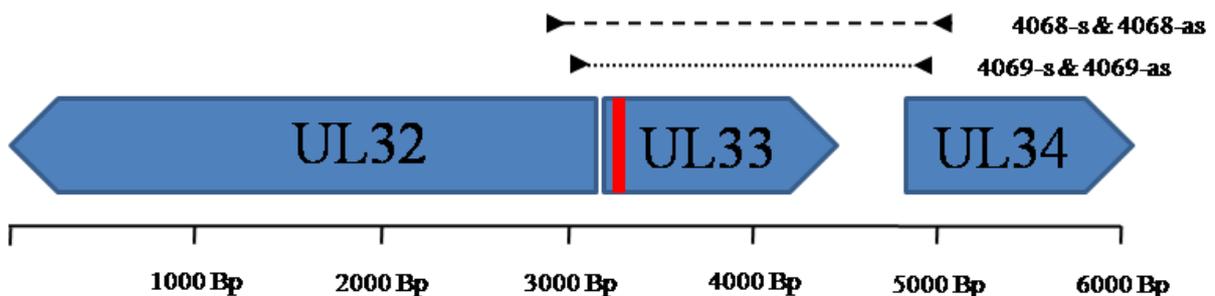


Abbildung 3.3: Darstellung der Gene UL32, UL33 und UL34 mit den Positionen der äußeren und inneren Primer der nested-PCR. Das UL33-Intron ist rot dargestellt.

3.1.4 Optimierung des Thermocyclings

Die Reaktionsbedingungen des Thermocyclers wurden ausgehend von den etablierten Standardprotokollen für die nested-PCR für gB und UL33 optimiert (siehe 2.2.5). Als Probenmaterial wurde aufgereinigte Virus-DNA aus AD169 sowie DNA aus verschiedenen CMV-positiven humanen Blutproben eingesetzt. Eingangs wurde unter Verwendung des Standard-PCR-Protokolls (siehe Abb. 2.5) für das gB-Gen und des ramp-time-PCR-Protokolls (siehe Abb.2.6) für das UL33-Gen die optimale Annealingtemperatur für die jeweiligen Primerpaare der ersten und zweiten Runden ermittelt. Alle Primer erwiesen sich als geeignet für eine Annealingtemperatur von 46°C, nur das Primerpaar 4008-s & 4008-as zeigte eine spezifischere Produktausbeute bei einer Annealingtemperatur von 53,4°C. Hierbei konnte eine unspezifische Nebenbande von ca. 650 Basen zugunsten des Amplifikats von ca. 480 Basen verringert werden.

Das äußere Primerpaar 4068-s & 4068-as der nested-PCR für UL33 zeigte bei einer Annealingtemperatur von 58,6°C eine verbesserte Amplifikationseffizienz. Jedoch erlaubt eine niedrigere Annealingtemperatur Primern auch die Anlagerung an Sequenzabschnitte, bei denen Basenfehlpaarungen vorliegen. Somit wurde das äußere Primerpaar bei einer bezüglich der Amplifikationseffizienz nicht optimalen Annealingtemperatur von 46°C eingesetzt, um die Sensitivität für hochdifferente Genotypen weiter zu steigern.

Nachfolgend wurde unter Verwendung der optimierten Annealingtemperaturen in identischen PCR-Ansätzen die Amplifikation unter den Reaktionsbedingungen des Standard-PCR-Protokolls und des ramp-time-PCR-Protokolls verglichen. Für UL33 stellte sich aufgrund unspezifischer Nebenbanden bei Anwendung des ramp-time-PCR-Protokolls das Standard-PCR-Protokoll als überlegen heraus, für gB konnte das ramp-time-PCR-Protokoll eingesetzt werden. Zur weiteren Optimierung der Reaktionsbedingungen wurde für UL33 die minimal nötige Elongationszeit ermittelt, um unspezifische Reaktionen der Polymerase zu unterbinden. Als optimale Elongationszeit für die erste Runde (bei einem Amplifikat von ca. 2405 Basen) zeigten sich 4 min und bei der zweiten Runde (bei einem Amplifikat von ca. 1823 Basen) 3 min.

Die für die PCR des gB-Gens optimale Elongationszeit lag bei beiden Runden bei einer Minute. Die entsprechend optimierten PCR zeigten zufriedenstellende Ergebnisse bezüglich Sensitivität und Spezifität. Bei Untersuchungen von Proben mit einer sehr hohen CMV-Viruslast zeigten sich jedoch teilweise unspezifische Nebenbanden. Um die in der Gelelektrophorese vorkommenden niedermolekularen Nebenbanden und unsaubere Auftrennung der Amplifikate zu vermindern, wurde die Zyklenzahl des ramp-time-PCR-Protokolls (gB) von 50 auf 40 Zyklen

Ergebnisse

verringert. Zudem wurde bei beiden PCR-Systemen das zu übertragene Volumen von der ersten in die zweite Runde von 1,5 µl auf 1 µl herabgesetzt.

Für die Amplifikationseffizienz von degenerierten Primern hat es sich als vorteilhaft erwiesen, je Ansatz 0,4 µl Polymerase einzusetzen (Nezlisah Yasmun, Diplomarbeit, unveröffentlicht), welches für alle PCR angewendet wurde. Die optimierten Reaktionsbedingungen der PCR-Systeme für gB und UL33 sind in den Tabellen 3.1 und 3.2 dargestellt.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	2 min	1x
Denaturierung	95°C	30 sec	
Primerannealing	46°C	30 sec	40x
Elongation	72°C	1 min	
Finale Elongation	72°C	10 min	1x

ramp-time 0,09 °C/min

Tabelle 3.1: Optimierte Reaktionsbedingungen der ersten und zweiten Runde des „ramp-time-PCR-Protokolls“ für gB. Erste Runde: Primerpaar 4007-s & 4007s-as; Zweite Runde: Primerpaar 4125-s & 4125-as. Bei dem alternativ einsetzbaren inneren Primerpaar 4008-s & 4008-as beträgt die Annealingtemperatur 53,4°C.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	12 min	1x
Denaturierung	95°C	20 sec	
Primerannealing	46°C	30 sec	45x
Elongation	72°C	4 min	
Finale Elongation	72°C	10 min	1x

Tabelle 3.2: Optimierte Reaktionsbedingungen der ersten Runde des „Standard-PCR-Protokolls“ für UL33. Erste Runde: Primerpaar 4068-s & 4068-as; Zweite Runde: Primerpaar 4069-s & 4069-as. In der zweiten Runde verkürzt sich die Elongationszeit auf 3 min.

3.1.5 Matrizingenerierung und PCR-Sensitivität

Zur Evaluierung der Sensitivität der Primersysteme wurde eine Matrize der zu untersuchenden Region jeweils für das gB-Gen und UL33-Gen aus AD169 erstellt. Die Matrize für das gB-Gen umfasste ca. 948 Bp und wurde mittels PCR mit den Primern 4006-s & 4006-as generiert (siehe Tab 2.1 A). Die Matrize für das UL33-Gen umfasste ca. 2531 Bp und wurde mittels nested-PCR mit den Primern 4208-s & 4208-as und 4105-s & 4105-as generiert (siehe Tab 2.1 B).

Von dem aufgereinigtem PCR-Produkt wurde die Konzentration in ng/µl spektrophotometrisch bestimmt. Die Matrize wurde durch mehrfache Sequenzierung und Abgleich mit AD169 auf Fehlerfreiheit überprüft.

3.1.6 Sensitivität der nested-PCR für das gB-Gen

Zur Bestimmung der Sensitivität der nested-PCR wurde aus der spektrophotometrisch bestimmten Matrizenkonzentration die Kopienzahl pro μl errechnet und in definierter Menge in Verdünnungsreihen mit verschiedenen log-Stufen in PCR-Ansätzen eingesetzt. Die äußeren Primer der nested-PCR 4007-s & 4007-as konnten 10 Kopien/ μl Matrize nachweislich amplifizieren (Abbildung 3.4). Durch Übertragung von 1,5 μl PCR-Ansatz in die zweite Runde und nachfolgende Amplifikation mittels der inneren Primer konnte die Sensitivität in diesem Modellversuch nicht um eine Log-Stufe verbessert werden.

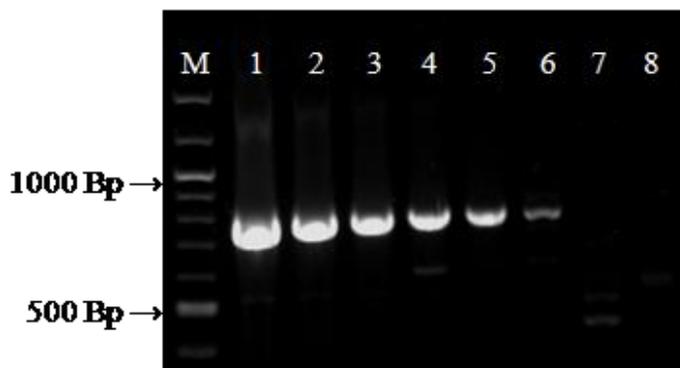


Abbildung 3.4: Sensitivität der äußeren Primer der nested-PCR für das gB-Gen. Gelelektrophoretische Auftrennung der Produkte der PCR. Die Banden in den Spuren 1 – 8 entsprechen den als Matrize eingesetzten Kopien von: 1) 10^7 ; 2) 10^5 ; 3) 10^4 ; 4) 10^3 ; 5) 10^2 ; 6) 10; 7) 1; 8) 10^{-1} . M = Marker: 100bp ladder.

3.1.7 Sensitivität der nested-PCR für das UL33-Gen

Durch definierten Einsatz der Matrize konnte ebenfalls für die UL33-PCR die Sensitivität bestimmt werden. Entsprechend der Nachweisgrenze der gB-PCR konnte auch für UL33 allein mittels der äußeren Primer 4068-s & 4068-as der degenerierten nested-PCR bei einer Verdünnung von 10 Kopien pro μl noch ein Amplifikat erhalten werden (Abbildung 3.5). Auch hier zeigte die Verwendung der inneren Primer keine Erhöhung der Sensitivität in log-Stufen.

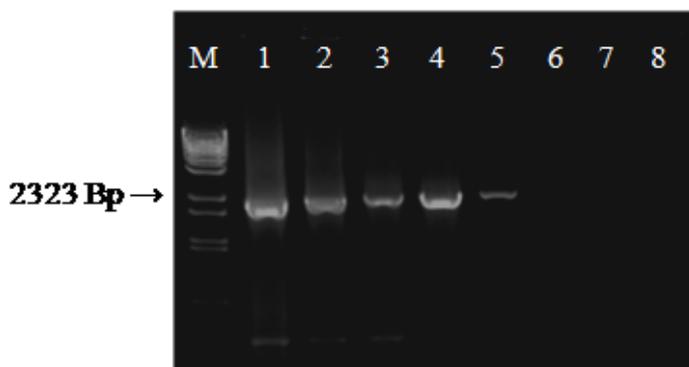


Abbildung 3.5: Sensitivität der äußeren Primer der nested-PCR für das UL33-Gen. Gelelektrophoretische Auftrennung der Produkte der PCR. Die Banden in den Spuren 1 – 8 entsprechen den als Matrize eingesetzten Kopien von: 1) 10^6 ; 2) 10^4 ; 3) 10^3 ; 4) 10^2 ; 5) 10; 6) 1; 7) 10^{-1} ; 8) 10^{-2} . M = Marker: Lambda *BstEII*.

3.2 Antisense locked-nucleic-acid Oligonukleotide in PCR

Ergänzend zu den degenerierten PCR sollten antisense locked-nucleic-acid Oligonukleotide (LNA) eingesetzt werden, um die Genotypisierung von mehreren in einer Probe vorkommenden CMV zu ermöglichen. Dazu müssen sich die LNA gegen genotypenspezifische Sequenzen von einzelnen gB- oder UL33-Typen richten. Die Zugabe der LNA in die PCR-Ansätze sollte durch Anlagerung die Amplifikation des Zielgenotyps unterbinden und damit die Amplifikation anderer in der Probe vorkommender Genotypen zulassen.

3.2.1 Design der LNA

Zur Auswahl von geeigneten Sequenzabschnitten für spezifische antisense LNA gegen einzelne HCMV-Genotypen wurden initial Konsensussequenzen der einzelnen Genotypen erzeugt. Hierzu wurden alle verfügbaren Sequenzen aus GenBank und eigenen Sequenzdaten für jeden Genotypen zusammengefasst und als alignment mittels MacVector dargestellt. Nachfolgend konnte in MacVector eine Konsensussequenz für jeden bekannten Genotyp erzeugt werden. Die variablen Sequenzabschnitte innerhalb der Gruppe eines Genotypen stellen sich in der Konsensussequenz als Ambiguitäten dar. In einem alignment der Konsensussequenzen verschiedener Genotypen konnten die geeigneten Bereiche für LNA ausgewählt werden (Abschnitte des alignments sind in Abb.3.6 dargestellt). Ein Bereich für eine spezifische LNA sollte möglichst divergent von allen anderen Genotypen sein (d.h. eine einmalige Basenfolge des Genabschnitts aufweisen), jedoch absolut einheitlich innerhalb desselben Genotyps (d.h. keine Ambiguitäten aufweisen). Für die spezifische Inhibition der vier cleavage-site gB-Genotypen (nach Chou *et al.*, 1991) wurden vier verschiedene LNA synthetisiert. LNA-gB-1 und LNA-gB-4

Ergebnisse

binden an den sense-Strang, LNA-gB-2 und LNA-gB-3 binden an den antisense-Strang.

Für die publizierten Sequenzen von UL33 bestand bisher keine numerische Einteilung. Für diese Arbeit wurde folgende Einteilung der Genotypen vorgenommen: UL33-1a entspricht der Basenfolge des Stamms Merlin, UL33-2 der des Stamms Toledo und UL33-3 der des Stamms AD169. Eine Variante des Genotyps UL33-1 kommt im Stamm Towne vor und wurde als UL33-1b bezeichnet (Ein Sequenzvergleich zur Einteilung der UL33-Genotypen erfolgt in Abschnitt 3.3.3, dort auch die accession numbers der Stämme). Für drei UL33-Genotypen wurden drei verschiedene LNA synthetisiert (siehe Abb. 2.2). LNA-UL33-1 bindet an den antisense-Strang von UL33-1a und -1b, LNA-UL33-2 und LNA-UL33-3 binden jeweils an den sense-Strang von UL33-2 beziehungsweise -3.

In Abbildung 3.6 ist ein alignment der Konsensussequenzen der Genotypen für gB (Abb. 3.6 A-D) und UL33 (Abb. 3.6 E-G) dargestellt. Die schwarzen Kästchen umrahmen die LNA und die LNA-substituierten Basen sind gelb hinterlegt. Zur LNA-Sequenz identische Basen der anderen Genotypen sind grün hinterlegt.

Ergebnisse

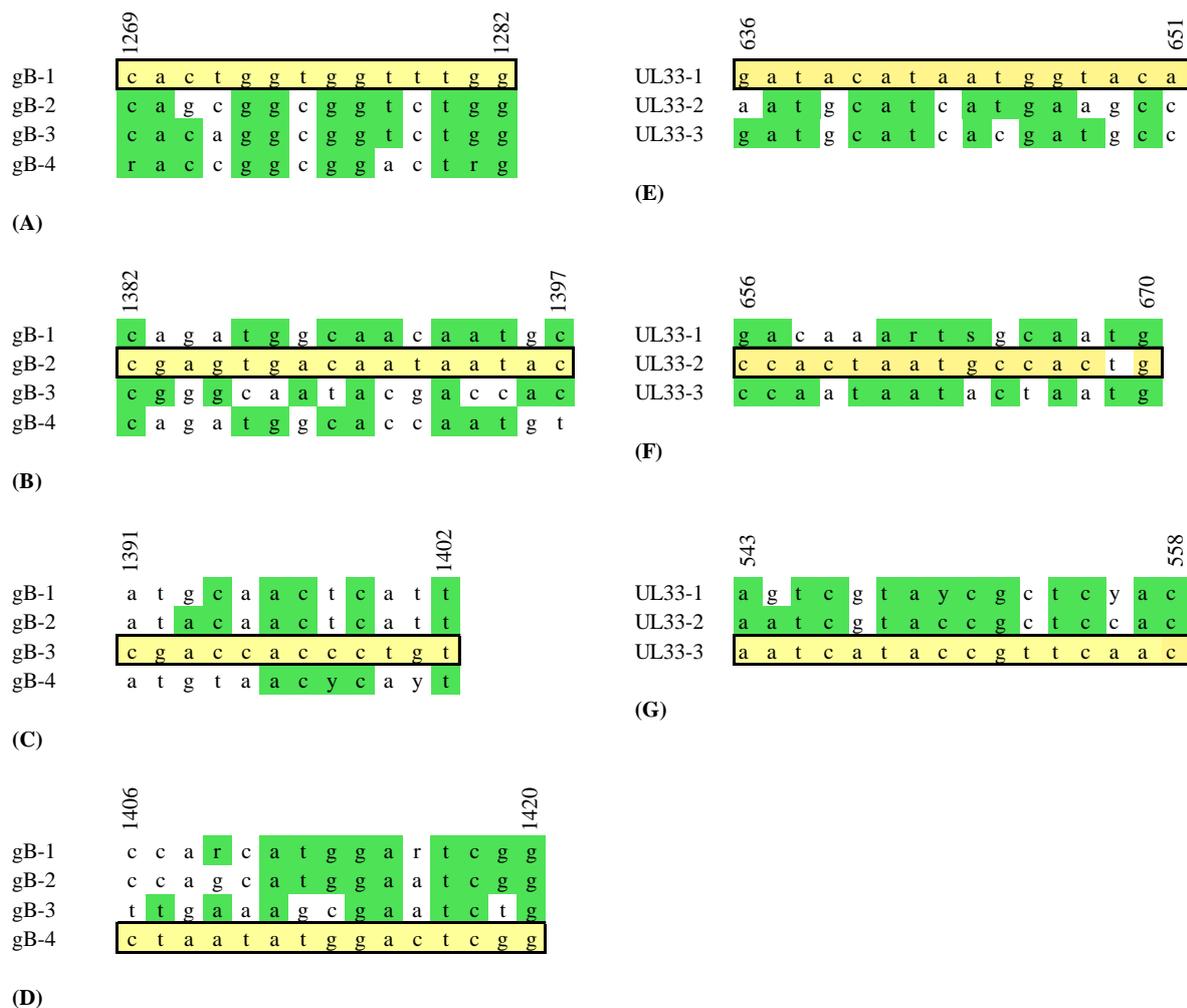


Abbildung 3.6: Bindungsstellen der antisense LNA-Oligonukleotide in den gB- (A-D) und UL33 (E-F) Genen. Schwarze Kästen umrahmen die Position der LNA, die substituierten Basen sind gelb hinterlegt. Das alignment erfolgt mit den Konsensussequenzen der anderen gB- beziehungsweise UL33-Genotypen. Identische Basen zur Sequenz der LNA sind grün hinterlegt. Die Positionen im gB- beziehungsweise UL33-Gen sind über dem alignment angegeben für: gB-1 (Acc.-No. M60929) (A), gB -Typ 2 (Acc.-No. X17403) (B), gB-3 (Acc.-No. M85228) (C) und gB-4 (Acc.-No. M60926) (D); sowie UL33-Typ 1 (Virusstamm Merlin; Acc.-No. NC006273) (E), UL33-Typ 2 (Strain Toledo; Acc.-No. AC146905) (F) and UL33-Typ 3 (Virusstamm AD169 Acc.-No. X17403) (G).

3.2.2 Auswirkungen der LNA auf die Amplifikation von gB-Genotypen in der PCR

Zur Evaluation ob und in welchem Ausmaß die LNA spezifisch einzelne gB-Genotypen von der Amplifikation in einer PCR ausschließen können, wurden Verdünnungsreihen der Matrizen der einzelnen Genotypen angefertigt. Die Generierung der Matrizen erfolgte mit dem Primerpaar 4006-s & 4006-as jeweils für jeden der vier gB-Genotypen. Ausgangsmaterial für gB-1 und 3 war Zellkulturüberstand mit den Probenbezeichnungen 927 und 933. Die Matrize für gB-2 wurde aus aufgereinigter Virus-DNA von AD169 erzeugt. Das Ausgangsmaterial der Matrize für gB-4 war eine humane Blutprobe aus dem Probenfundus der Projektgruppe 14 des RKI mit der Bezeichnung 465. Alle Matrizen wurden durch mehrfaches Sequenzieren überprüft. Es wurde

Ergebnisse

die Kopienzahl pro μl bestimmt und anhand dessen Verdünnungsreihen erstellt, welche jeweils acht Verdünnungsstufen von 10^8 bis 10^{-1} Kopien umfassten. Anschließend wurde der spezifisch inhibierende Effekt der LNA an den Verdünnungsreihen gezielt untersucht. Sowohl der Faktor der inhibierenden Wirkung als auch die Spezifität dieser Reaktion sollte gezeigt werden. Zur PCR-Amplifikation diente das Primerpaar 4007-s & 4007-as. Alle Verdünnungsstufen jeder Verdünnungsreihe wurde in jeweils fünf verschiedenen PCR untersucht: jeweils gB-1-LNA, gB-2-LNA, gB-3-LNA, gB-4-LNA und ein Kontrollansatz ohne LNA. Abbildung 3.7 bis 3.10 zeigen die Ergebnisse der Gelelektrophoresen.

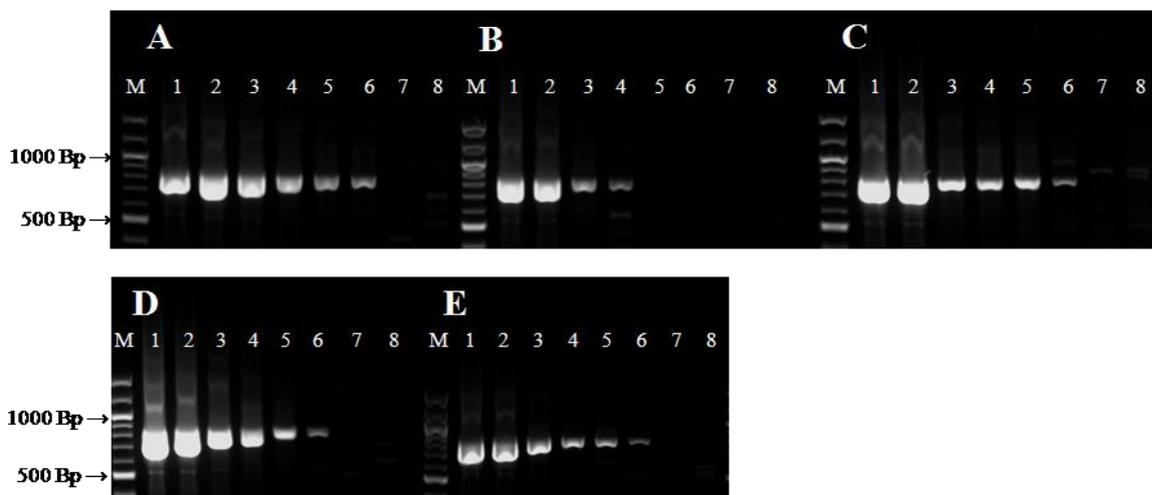


Abbildung 3.7: Gelelektrophoretische Auftrennung zur Darstellung der Inhibitionswirkung und Spezifität der gB-LNA an einer gB-1-Matrize. Amplifikate einer PCR mit den Primern 4007-s & 4007-as an verschiedenen Verdünnungsstufen einer gB-1-Matrize. In A wurden keine LNA zugesetzt, in B gB-1-LNA, in C gB-2-LNA, in D gB-3-LNA und in E gB-4-LNA. In den Spuren 1 – 8 wurden als Matrize Kopienzahlen von: 1) 10^8 ; 2) 10^6 ; 3) 10^4 ; 4) 10^3 ; 5) 10^2 ; 6) 10; 7) 1; 8) 10^{-1} Kopien eingesetzt. M = Marker: 100bp ladder.

Abbildung 3.7 zeigt die Auftrennung der Produkte der Verdünnungsreihe des gB-1 nach den verschiedenen PCR. Die vier Verdünnungsreihen, die als Zusatz keine LNA (A), gB-2-LNA (C), gB-3-LNA (D) und gB-4-LNA (E) aufweisen, zeigen Banden mit zunehmender Stärke von einer Kopienzahl von 10 Kopien an (Abb. 3.7 A, C, D und E, Gelspur 6). Bei Zusatz von gB-1-LNA konnte ein Amplifikat ab einer Kopienzahl von 1000 erhalten werden (siehe Abbildung 3.7 B, Spur 4). Im Vergleich war die Amplifikatstärke der Produkte der Kopienzahlen 10.000 und 1000 bei gB-1-LNA-Zusatz geringer als die der Amplifikate der entsprechenden Banden unter Zusatz von anderen gB-LNA oder bei Amplifikation ohne LNA-Zusatz. Dies entspricht einer Inhibierung der Amplifikation unter Gegenwart der gB-1-LNA um den Faktor >100 .

Abbildung 3.8 zeigt die Auftrennung der PCR-Produkte der Verdünnungsreihe des gB-2 ohne Zusatz von LNA (A), mit gB-1-LNA, gB-2-LNA (C), gB-3-LNA (D) und gB-4-LNA (E). Ab

Ergebnisse

einer Kopienzahl von ca. 130 (Gelspur 5) ergeben sich in Versuchen A, B und E deutliche Banden, in Versuchen A und B bereits schwache Banden bei 10 Kopien (Gelspur 6). Unter Zusatz von gB-2-LNA und gB-3-LNA zeigten sich Banden ab einer Kopienzahl von ca. 1300 (Gelspur 4). Vergleichend zur Amplifikation ohne LNA-Zusatz zeigt gB-2-LNA eine Inhibition der Amplifikation einen Faktor von ca. 100 (Abb.3.8 C). In zwei unabhängigen Experimenten (zweites Experiment nicht dargestellt) konnte wiederholt nachgewiesen werden, dass gB-3-LNA die Amplifikation von gB-2 vermindert. Der Inhibitionsfaktor liegt zwischen 10 und 100 (Abb. 3.8 D).

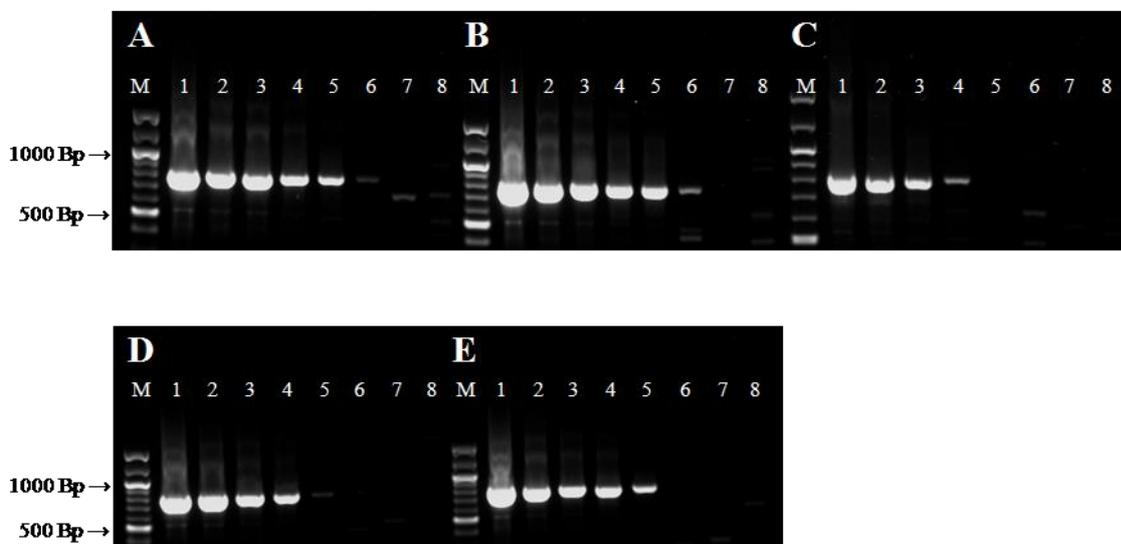


Abbildung 3.8: Gelelektrophoretische Auftrennung zur Darstellung der Inhibitionswirkung und Spezifität der gB-LNA an einer gB-2-Matrize. Amplifikate einer PCR mit den Primern 4007-s & 4007-as an verschiedenen Verdünnungsstufen einer gB-2-Matrize. In A wurden keine LNA zugesetzt, in B gB-1-LNA, in C gB-2-LNA, in D gB-3-LNA und in E gB-4-LNA. In den Spuren 1 – 8 wurden als Matrize Kopienzahlen des 1,26-fachen von: 1) 10^{08} ; 2) 10^{06} ; 3) 10^{04} ; 4) 10^{03} ; 5) 10^{02} ; 6) 10; 7) 1; 8) 10^{-01} Kopien eingesetzt. M = Marker: 100bp ladder.

Die Auftrennung der Produkte der Verdünnungsreihe des gB-3 (Abbildung 3.9) zeigen in Abwesenheit von LNA (A), bei Zusatz von gB-1-LNA (B), gB-2-LNA (C) und gB-4-LNA (E) alle eine sichtbare PCR-Amplifikation ab 10 eingesetzten Kopien (Gelspur 6). In Gegenwart von gB-3-LNA ergibt sich eine Amplifikation ab 1000 Kopien (Abb. 3.9 D, Gelspur 4), einem Inhibitionsfaktor von ca. 100 entsprechend.

Die Auftrennung der Produkte der Verdünnungsreihe des gB-4 (Abbildung 3.10) zeigen in Abwesenheit von LNA (A), bei Zusatz von gB-1-LNA (B), gB-2-LNA (C) und gB-3-LNA (E) alle eine sichtbare PCR-Amplifikation ab 10 eingesetzten Kopien (Gelspur 6). In Gegenwart von gB-4-LNA erfolgt eine Amplifikation ab 1000 Kopien, entsprechend einem Inhibitionsfaktor von >100 .

Ergebnisse

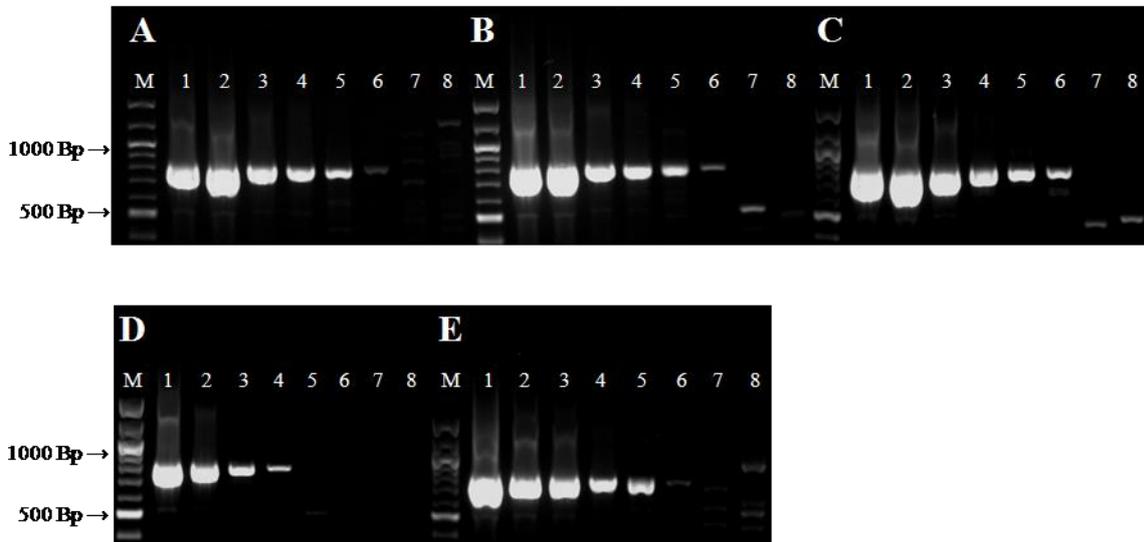


Abbildung 3.9: Gelelektrophoretische Auftrennung zur Darstellung der Inhibitionswirkung und Spezifität der gB-LNA an einer gB-3-Matrize. Amplifikate einer PCR mit den Primern 4007-s & 4007-as an verschiedenen Verdünnungsstufen einer gB-3-Matrize. In A wurden keine LNA zugesetzt, in B gB-1-LNA, in C gB-2-LNA, in D gB-3-LNA und in E gB-4-LNA. In den Spuren 1 – 8 wurden als Matrize Kopienzahlen von: 1) 10^{08} ; 2) 10^{06} ; 3) 10^{04} ; 4) 10^{03} ; 5) 10^{02} ; 6) 10; 7) 1; 8) 10^{-01} Kopien eingesetzt. M = Marker: 100bp ladder.

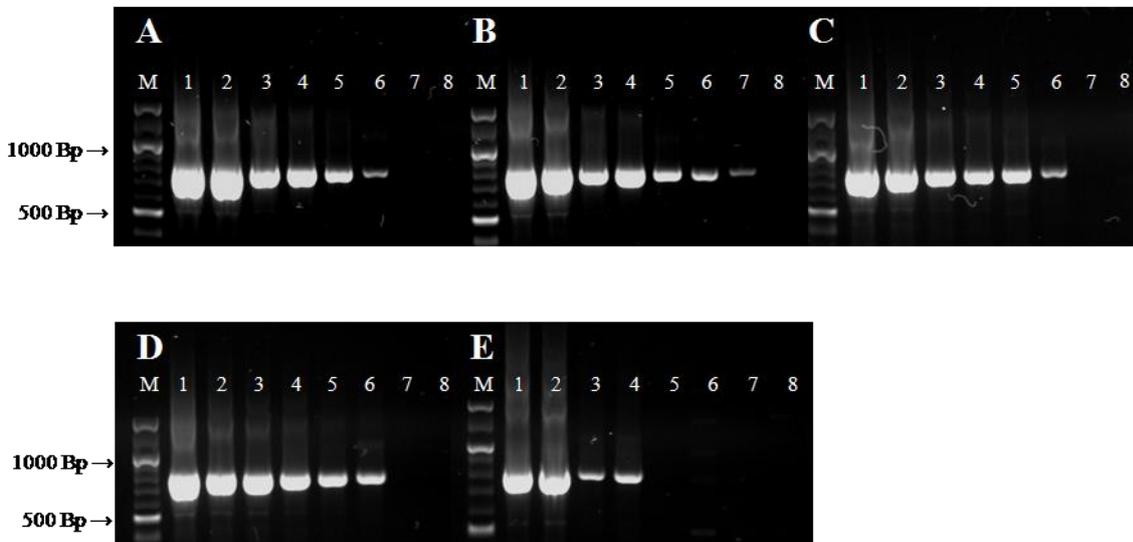


Abbildung 3.10: Gelelektrophoretische Auftrennung zur Darstellung der Inhibitionswirkung und Spezifität der gB-LNA an einer gB-4-Matrize. Amplifikate einer PCR mit den Primern 4007-s & 4007-as an verschiedenen Verdünnungsstufen einer gB-4-Matrize. In A wurden keine LNA zugesetzt, in B gB-1-LNA, in C gB-2-LNA, in D gB-3-LNA und in E gB-4-LNA. In den Spuren 1 – 8 wurden als Matrize Kopienzahlen von: 1) 10^{08} ; 2) 10^{06} ; 3) 10^{04} ; 4) 10^{03} ; 5) 10^{02} ; 6) 10; 7) 1; 8) 10^{-01} Kopien eingesetzt. M = Marker: 100bp ladder.

Ergebnisse

Vergleichend zur Amplifikation ohne LNA-Zusatz ergab sich für alle gB-LNA nach Ablauf einer einfachen PCR mit den Primern 4007-s & 4007-as ein spezifischer Inhibitionsfaktor von ca. 100. Als einzige unspezifische Interaktion konnte eine Inhibition um einen Faktor von ca. 10 von gB-2 durch die gB-3-LNA festgestellt werden. Die Inhibitionsfaktoren der verschiedenen gB-LNA sind in Tabelle 3.3 dargestellt.

CMV-Genotyp	Kopienzahl der PCR-Detektion ohne LNA	Kopienzahl der PCR-Detektion mit LNA	Inhibitionsfaktoren der den Genotypen zugehörigen LNA
gB-1	10^1	10^3	100
gB-2	10^1	10^3	100
gB-3	10^1	10^3	100
gB-4	10^1	10^3	100

Tabelle 3.3: Inhibitionsfaktoren der gB-LNA

3.2.3 Auswirkungen der LNA auf die Amplifikation mehrerer gB-Matrizen in einzelnen PCR

Zur Überprüfung der Eignung von antisense LNA zur spezifischen und effektiven Inhibition von gB-Typen bei der Untersuchung einer mischinfizierten Probe wurden artifizielle Matrizenmischungen aus den vier gB-Genotypen gB-1 bis gB-4 hergestellt. Hierzu wurden Verdünnungen von Matrizen verschiedener gB-Genotypen gemischt und unter Verwendung von antisense LNA mittels der Primer 4007-s & 4007-as und 4125-s & 4125-as untersucht. Eine je gB-Genotyp jeweils 100 Kopien enthaltende Ausgangsmischung wurde mit jeweils drei gB-LNA einer PCR unterzogen. Erwartet wurde eine Amplifikation des gB-Genotypen, gegen den keine LNA in dem PCR-Ansatz vorhanden war. Produkte der Amplifikation konnten für alle vier Ansätze dargestellt werden. Die Ergebnisse der nachfolgenden Sequenzierung wurden mit den bekannten Ausgangssequenzen der einzelnen gB-Matrizen verglichen.

In Gegenwart der gB-2-LNA, gB-3-LNA und gB-4-LNA zeigte sich eine 100% Übereinstimmung des Amplifikats mit der Sequenzierung des gB-1-Matrizen und in Gegenwart der gB-1-LNA, gB-3-LNA und gB-4-LNA ergab sich eine 99% Übereinstimmung des Amplifikats mit der Sequenzierung des gB-2-Matrizen. In Gegenwart der gB-1-LNA, gB-2-LNA und gB-4-LNA zeigte sich eine 100% Übereinstimmung des Amplifikats mit der Sequenzierung des gB-3-Matrizen und in Gegenwart der gB-1-LNA, gB-2-LNA, gB-3-LNA ergab sich eine 99%

Übereinstimmung des Amplifikats mit der Sequenzierung des gB-4-Matrizen. Jeweils zwei einzelne Basenabweichungen sind für die unvollständige Übereinstimmung von gB-2 und gB-2-Matrize sowie gB-4 und gB-4-Matrize verantwortlich. Somit konnte nachgewiesen werden, dass alle LNA in PCR spezifisch die Amplifikation von Matrizen ermöglichen und die Amplifikation „ihres“ spezifischen Genotypen unterbinden können.

3.3 Untersuchung von Humanproben mittels PCR und LNA

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung universeller PCR zur Genotypisierung von CMV in den Genen UL55 und UL33. Der Einsatz von genotypenspezifischen LNA sollte die Detektion von mehreren Genotypen in einer Probe ermöglichen. Nach Entwicklung und Evaluation der Methodik sollte eine Gruppe von immunsupprimierten Patienten auf vorkommende HCMV-Genotypen untersucht werden. Zudem wurden noch Viruszellkulturüberstände (insgesamt 5) und einzelne Humanproben genotypisiert, die nicht von immunsupprimierten Patienten stammten (insgesamt 3). Die Bestimmung der amplifizierten Genotypen erfolgte durch Sequenzierung und Abgleich mit Sequenzen bereits bekannter Genotypen.

3.3.1 Detektion und Zuordnung von gB-Genotypen

Die durch die gB-PCR amplifizierten Sequenzabschnitte der cleavage-site wurden mit den bereits bekannten gB-Genotypen in einem Nukleinsäurealignment abgeglichen. Hierzu dienten die gB-Genotypen 1-5 nach Chou *et al.* (1991) und Shepp *et al.* (1998). Abbildung 3.11 zeigt einen phylogenetischen Stammbaum der fünf Genotypen aufbauend auf der Aminosäuresequenz des gesamten gB. Als outgroup dient die gB-Sequenz von Schimpansen-CMV. Für gB 1-4 wurden hierbei bereits publizierte Sequenzen verwendet (accession numbers siehe Abb. 3.11), die gesamte Nukleinsäuresequenz und damit die hier verwendete putative Aminosäuresequenz von gB-5 war bislang nicht bekannt und wurde von der Arbeitsgruppe Ehlers *et al.* (unpubliziert) nach Detektion von gB-5 in dieser Arbeit bestimmt. Tabelle 3.4 zeigt für den Stammbaum aus Abb. 3.11 die von MacVector errechneten Übereinstimmungen der gB-Genotypen für identische (horizontal) beziehungsweise gleichartige (senkrecht) Aminosäuren in Prozent. Größte Identität zeigen hierbei gB-1 und gB-4 mit 95,9 %. gB-5 ist der divergenteste Genotyp und zeigt größte Ähnlichkeit zu gB-3 mit 93,3% Identität. In Anbetracht der Fülle von bereits vorliegenden Sequenzinformationen zu gB (z.B. in der GenBank) wird in dieser Arbeit auf weitergehende Sequenzdarstellungen von gB verzichtet.

Ergebnisse

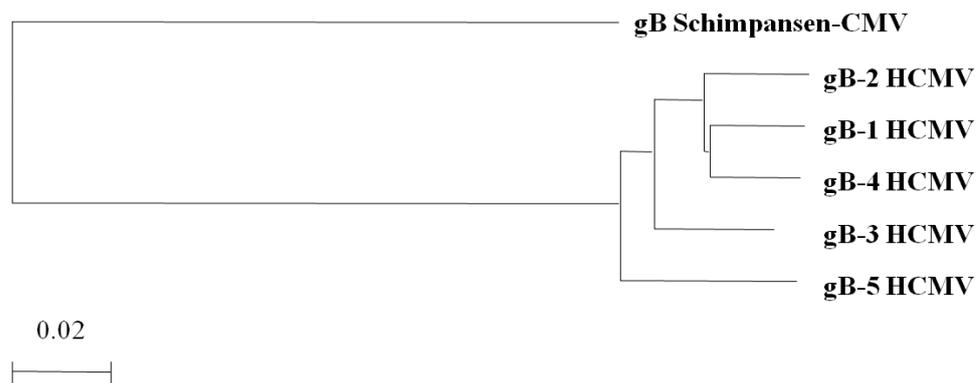


Abbildung 3.11: Phylogenetischer Stammbaum der gB-Genotypen basierend auf den putativen Aminosäuresequenzen des gesamten gB-Gens. Als outgroup dient die gB-Sequenz von Schimpansen-CMV, Acc.-no. AF480884. gB-1 Acc.-no. M60929; gB-2 Acc.-no. X17403; gB-3 Acc.-no. M85228; gB-4 Acc.-no. M60926; gB-5 Sequenz aus Humanprobe 462, Ehlers *et al.*, unpubliziert. Generiert in MacVector mittels Neighbour-Joining, Best Tree Modus, zufällige Baumverzweigungen, Ignorieren aller Sequenzlücken.

		Aminosäuren Identität				
		in %				
		gB-1	gB-2	gB-3	gB-4	gB-5
Gleichartigkeit in Aminosäuren %	gB-1	100	95	93.2	95.9	93.1
	gB-2	96.9	100	94.6	95.4	91.5
	gB-3	95.5	96.9	100	94.5	93.3
	gB-4	97.7	97.7	97	100	91
	gB-5	96.9	96	96.4	95.4	100

Tabelle 3.4: Aminosäure-Übereinstimmungen der gB-Genotypen in Prozent. MacVector-Berechnung der Identität (horizontal) und Gleichartigkeit (senkrecht) von Aminosäuren der einzelnen gB-Genotypen im Vergleich. Die verwendeten Sequenzdaten entsprechen denen aus Abb. 3.11.

3.3.2 Detektion eines unbekanntes UL33-Genotyps

Im Rahmen der Untersuchung von Humanproben wurde in der Humanprobe 903 von einem deutschen Patienten mit unklarer Anämie, der UL33-Genotyp 1 amplifiziert. Durch Wiederholung der PCR in Gegenwart von UL33-1-LNA konnte eine bisher unbekanntes UL33-Sequenz amplifiziert werden, die als UL33-Genotyp 4 bezeichnet wurde (siehe Tab. 3.6). Das PCR-Amplifikat von UL33-4 umfasste Teile des 5'-Endes des invers orientierten UL32-Gens, das gesamte UL33-Gen sowie Teile des 5'-Bereichs des UL34-Gens (siehe Abbildung 3.3). Der Anteil von UL33-4 bestand aus 1417 Bp (inklusive des Stop-Codons). Da bekannt ist, dass UL33 gespleißt wird und zwei Exons aufweist (Davis-Poynter *et al.*, 1997), konnten *in silico* vergleichend mit den Genotypen 1 -3 die Spleißstellen im Bereich des UL33-4 dargestellt

werden. Das putative gespleißte UL33-4 hat eine Länge von 1242 Bp (Exon 1: 27 Bp; Exon 2: 1212 Bp) und kodiert für 413 Aminosäuren. Sequenzvergleiche von UL33-4 mit den UL33-Genotypen 1-3 erfolgen in Abschnitt 3.3.3 und 3.3.4.

3.3.3 Detektion und Zuordnung von UL33-Genotypen

Durch die UL33-nested-PCR erfolgte die Amplifikation des gesamten UL33. Die Bestimmung der amplifizierten Genotypen erfolgte durch Sequenzierung und Vergleich der Sequenzdaten mit den bereits publizierten Sequenzen für die Genotypen 1-3.

In Abb. 3.12 ist ein phylogenetischer Stammbaum von UL33 dargestellt, basierend auf den putativen Aminosäuresequenzen des gesamten, gespleißten UL33. Der neuartige Genotyp UL33-4 ist dort vergleichend zu den bekannten Genotypen dargestellt; als outgroup dient UL33 aus Schimpansen-CMV.

Tabelle 3.5 zeigt die von MacVector errechneten Übereinstimmungen der UL33-Genotypen für identische (horizontal) beziehungsweise gleichartige (senkrecht) Aminosäuren in Prozent, basierend auf dem Stammbaum von Abb. 3.12. Phylogenetische Untersuchungen der bereits publizierten genotypischen Varianten von UL33 zeigten vier verschiedene Genotypen, die in den Stämmen Merlin, Towne, Toledo und AD169 vorkommen (accession numbers siehe Abb. 3.12). Die geringste Inter-genotypenvariabilität zeigte sich auf Aminosäureebene zwischen Stamm Merlin und Towne mit 97,1% identischen Aminosäuren und die Genotypen wurden als UL33-1a respektive UL33-1b bezeichnet (Tab. 3.5). Die Genotypen aus den Stämmen Toledo und AD169 wurden mit UL33-2 und UL33-3 bezeichnet und zeigen auf Aminosäureebene größte Ähnlichkeit zueinander mit 94,7% Identität. Die neuartige Sequenz aus Humanprobe 903 wurde als UL33-4 bezeichnet und stellt den bisher divergentesten aller UL33-Genotypen dar, bei größter Ähnlichkeit zu UL33-1b mit 94,4% Identität auf Aminosäureebene.

Ein Aminosäurealignment der UL33-Genotypen 1-4 (siehe Abb. 3.13) zeigt, dass sich die einzelnen Genotypen durch jeweils einzigartige Aminosäurevariationen voneinander abgrenzen. Vor allem die Genotypen UL33-1a und UL33-1b als auch UL33-2 und UL33-3 zeigen gemeinsame Aminosäurevariationen gegenüber den anderen Genotypen, wobei sich die beiden Paare relativ ähnlichen Genotypen wieder untereinander durch einzigartige Aminosäurevariationen unterscheiden (siehe Abb. 3.13). Somit liegen keine Hinweise auf homologe Rekombination zwischen den einzelnen UL33-Genotypen vor.

Ergebnisse

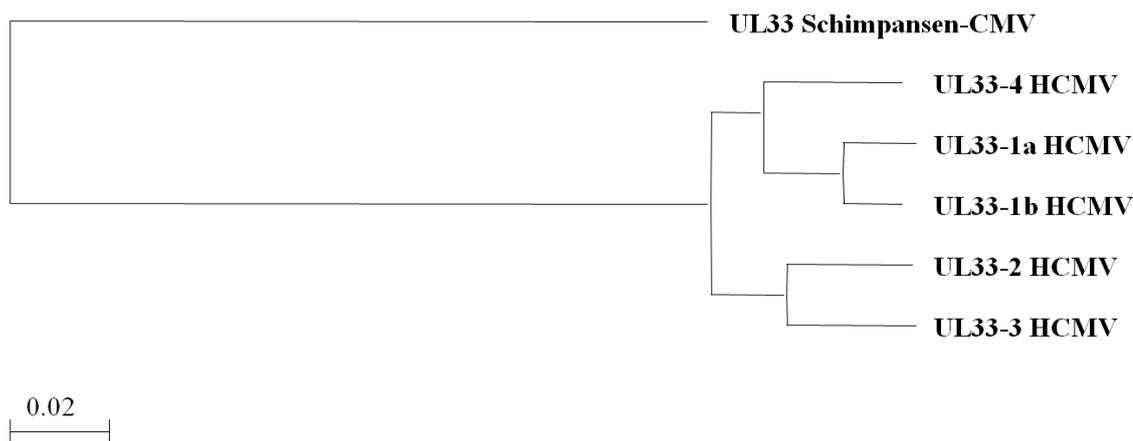


Abbildung 3.12: Phylogenetischer Stammbaum der UL33-Genotypen basierend auf den putativen Aminosäuresequenzen des gesamten UL33-Gens. Als outgroup dient die UL33-Sequenz von Schimpansen-CMV, Acc.-no. AF480884. UL33-4 Sequenz aus Humanprobe 903, B. Ehlers und M. Deckers, unpubliziert; Stamm Merlin Acc.-no. AY446894; Stamm Towne Acc.-no. AY315197; Stamm Toledo Acc.-no. AY486470; Stamm AD169 Acc.-no. X17403. Generiert in MacVector bei Neighbour-Joining, Best Tree Modus, zufällige Baumverzweigungen, Ignorieren aller Sequenzlücken.

		Aminosäuren Identität in %				
		UL33-1a	UL33-1b	UL33-2	UL33-3	UL33-4
Gleichartigkeit in Aminosäuren %	UL33-1a	100	97.1	90.3	90.8	93.2
	UL33-1b	98.3	100	90.6	90.8	94.4
	UL33-2	94.7	94.9	100	94.7	92.7
	UL33-3	95.9	95.9	97.8	100	91.8
	UL33-4	96.1	96.4	96.6	96.6	100

Tabelle 3.5: Aminosäure-Übereinstimmungen der UL33-Genotypen in Prozent. MacVector-Berechnung der Identität (horizontal) und Gleichartigkeit (senkrecht) von Aminosäuren der einzelnen gB-Genotypen im Vergleich. Die verwendeten Sequenzdaten entsprechen denen aus Abb. 3.11.

3.3.4 UL33-Sequenzvergleich und Berechnungen zur UL33-Proteinstruktur

Das Translationsprodukt des gespleißten UL3-4 wurde durch die Software des Split-4-Servers auf seine putative Struktur untersucht und stellt mit hoher Wahrscheinlichkeit einen Sieben-Transmembranrezeptor dar (accessed 20.12.2008 at <http://split.pmfst.hr/split/4/>; Juretic *et al.*, 2002). Strukturvoraussagen für die anderen UL33-Genotypen zeigten geringe Abweichungen der Positionen der Transmembrandomänen (maximal eine Aminosäure) vergleichend zu denen für UL33-4 errechneten (nicht aufgeführte Daten). In Abbildung 3.13 ist ein alignment der

Ergebnisse

putativen, gespleißten UL33-Aminosäuresequenzen dargestellt. Zudem sind über dem alignment die Ausdehnungen der vermuteten Domänen der Proteinstruktur des GPCR angegeben. Als variable Bereiche stellen sich die vermuteten Abschnitte der extrazellulären Domäne sowie der extrazellulären Schleife 2 dar. Geringere Variabilität liegt auch in den errechneten Abschnitten der extrazellulären Schleifen 1 und 3 und einiger Transmembrandomänen vor, wobei die vermutlich intrazellulären Rezeptorabschnitte relativ konserviert scheinen.

Ergebnisse

	Extrazelluläre Domäne															TM1																																				
UL33-1a HCMV Merlin	1	M	D	T	I	I	H	N	T	T	N	R	S	T	D	T	P	H	V	N	I	T	C	N	I	T	E	P	L	S	A	I	R	T	T	E	A	V	I	N	T	F	I	I	F	V	G	G	P	L	N	50
UL33-1a HCMV #1506	1	M	D	T	I	I	H	N	T	T	N	R	S	T	D	T	P	H	V	N	I	T	C	N	I	T	E	P	L	S	A	I	R	T	T	E	A	V	I	N	T	F	I	I	F	V	G	G	P	L	N	50
UL33-1a HCMV #1409	1	M	D	T	I	I	H	N	T	T	N	R	S	T	D	T	P	H	V	N	I	T	C	N	I	T	E	P	L	S	A	I	R	T	T	E	A	V	I	N	T	F	I	I	F	V	G	G	P	L	N	50
UL33-1b HCMV Towne	1	M	D	T	I	I	H	N	T	T	N	R	S	T	S	T	P	H	V	N	S	T	C	N	M	T	E	P	L	S	A	I	R	T	T	E	A	V	I	N	T	F	I	I	F	V	G	G	P	L	N	50
UL33-1b HCMV #767	1	M	D	T	I	I	H	N	T	T	N	R	S	T	S	T	P	H	V	N	S	T	C	N	M	T	E	P	L	S	A	I	R	T	T	E	A	V	I	N	T	F	I	I	F	V	G	G	P	L	N	50
UL33-1b HCMV #747	1	M	D	T	I	I	H	N	T	T	N	R	S	T	S	T	P	H	V	N	S	T	C	N	M	T	E	P	L	S	A	I	R	T	T	E	A	V	I	N	T	F	I	I	F	V	G	G	P	L	N	50
UL33-2 HCMV Toledo	1	M	D	T	I	I	H	N	S	-	T	R	N	T	T	T	P	H	I	N	D	T	C	N	M	T	G	P	L	F	A	I	R	T	T	E	A	V	L	N	T	L	I	I	F	V	G	G	P	L	N	49
UL33-2 HCMV #933	1	M	D	T	I	I	H	N	S	-	T	R	N	T	T	T	P	H	I	N	D	T	C	N	M	T	G	P	L	F	A	I	R	T	T	E	A	V	L	N	T	L	I	I	F	V	G	G	P	L	N	49
UL33-2 HCMV #1501	1	M	D	T	I	I	H	N	S	-	T	R	N	T	T	T	P	H	I	N	D	T	C	N	M	T	G	P	L	F	A	I	R	T	T	E	A	V	L	N	T	L	I	I	F	V	G	G	P	L	N	49
UL33-3 HCMV AD169	1	M	D	T	I	I	H	N	S	V	T	R	N	N	T	P	P	H	I	N	D	T	C	N	M	T	G	P	L	F	A	I	R	T	T	E	A	V	L	N	T	F	I	I	F	V	G	G	P	L	N	50
UL33-3 HCMV #1521	1	M	D	T	I	I	H	N	S	-	T	R	N	N	T	P	P	H	I	N	D	T	C	N	M	T	G	P	L	F	A	I	R	T	T	E	A	V	L	N	T	F	I	I	F	V	G	G	P	L	N	49
UL33-4 HCMV #903	1	M	D	T	I	I	H	N	T	T	I	R	N	T	S	T	P	H	V	N	S	T	C	N	M	T	E	P	L	F	A	I	R	T	T	E	A	V	I	N	A	L	I	I	F	V	G	G	P	L	N	50

	TM1					IS1					TM2					ES1																																				
UL33-1a HCMV Merlin	51	A	I	V	L	I	T	Q	L	L	T	N	R	V	L	G	Y	S	T	P	T	I	Y	M	T	N	L	Y	S	T	N	F	L	T	L	T	V	L	P	F	I	V	L	S	N	Q	W	L	L	P	A	100
UL33-1a HCMV #1506	51	A	I	V	L	I	T	Q	L	L	T	N	R	V	L	G	Y	S	T	P	T	I	Y	M	T	N	L	Y	S	T	N	F	L	T	L	T	V	L	P	F	I	V	L	S	N	Q	W	L	L	P	A	100
UL33-1a HCMV #1409	51	A	I	V	L	I	T	Q	L	L	T	N	R	V	L	G	Y	S	T	P	T	I	Y	M	T	N	L	Y	S	T	N	F	L	T	L	T	V	L	P	F	I	V	L	S	N	Q	W	L	L	P	A	100
UL33-1b HCMV Towne	51	A	I	V	L	V	T	Q	L	L	T	N	R	V	L	G	Y	S	T	P	T	I	Y	M	T	N	L	Y	S	T	N	F	L	T	L	T	V	L	P	F	I	V	L	S	N	Q	W	L	L	P	A	100
UL33-1b HCMV #767	51	A	I	V	L	V	T	Q	L	L	T	N	R	V	L	G	Y	S	T	P	T	I	Y	M	T	N	L	Y	S	T	N	F	L	T	L	T	V	L	P	F	I	V	L	S	N	Q	W	L	L	P	A	100
UL33-1b HCMV #747	51	A	I	V	L	V	T	Q	L	L	T	N	R	V	L	G	Y	S	T	P	T	I	Y	M	T	N	L	Y	S	T	N	F	L	T	L	T	V	L	P	F	I	V	L	S	N	Q	W	L	L	P	A	100
UL33-2 HCMV Toledo	50	A	I	V	L	V	T	Q	L	L	T	N	R	V	L	G	Y	S	T	P	T	I	Y	M	T	N	L	Y	S	T	N	F	L	T	L	T	V	L	P	F	I	V	L	S	N	Q	W	L	L	P	A	99
UL33-2 HCMV #933	50	A	I	V	L	V	T	Q	L	L	T	N	R	V	L	G	Y	S	T	P	T	I	Y	M	T	N	L	Y	S	T	N	F	L	T	L	T	V	L	P	F	I	V	L	S	N	Q	W	L	L	P	A	99
UL33-2 HCMV #1501	50	A	I	V	L	V	T	Q	L	L	T	N	R	V	L	G	Y	S	T	P	T	I	Y	M	T	N	L	Y	S	T	N	F	L	T	L	T	V	L	P	F	I	V	L	S	N	Q	W	L	L	P	A	99
UL33-3 HCMV AD169	50	A	I	V	L	I	T	Q	L	L	T	N	R	V	L	G	Y	S	T	P	T	I	Y	M	T	N	L	Y	S	T	N	F	L	T	L	T	V	L	P	F	I	V	L	S	N	Q	W	L	L	P	A	100
UL33-3 HCMV #1521	50	A	I	V	L	I	T	Q	L	L	T	N	R	V	L	G	Y	S	T	P	T	I	Y	M	T	N	L	Y	S	T	N	F	L	T	L	T	V	L	P	F	I	V	L	S	N	Q	W	L	L	P	A	99
UL33-4 HCMV #903	51	A	I	V	L	V	T	Q	L	L	T	N	R	V	L	G	Y	S	T	P	T	I	Y	M	T	N	L	Y	S	T	N	F	L	T	L	T	V	L	P	F	I	V	L	S	N	Q	W	L	L	P	A	100

	ES1					TM3					IS2					TM4																																					
UL33-1a HCMV Merlin	101	S	V	A	S	C	K	F	L	S	V	I	Y	Y	S	S	C	T	V	G	F	A	T	V	A	L	I	A	A	D	R	Y	R	V	L	H	K	R	T	Y	A	R	Q	S	Y	R	S	T	Y	I	I	150	
UL33-1a HCMV #1506	101	S	V	A	S	C	K	F	L	S	V	I	Y	Y	S	S	C	T	V	G	F	A	T	V	A	L	I	A	A	D	R	Y	R	V	L	H	K	R	T	Y	A	R	Q	S	Y	R	S	T	Y	I	I	150	
UL33-1a HCMV #1409	101	S	V	A	S	C	K	F	L	S	V	I	Y	Y	S	S	C	T	V	G	F	A	T	V	A	L	I	A	A	D	R	Y	R	V	L	H	K	R	T	Y	A	R	Q	S	Y	R	S	T	Y	I	I	150	
UL33-1b HCMV Towne	101	S	V	T	S	C	K	F	L	S	V	I	Y	Y	S	S	C	T	V	G	F	A	T	V	A	L	I	A	A	D	R	Y	R	V	L	H	K	R	T	Y	A	R	Q	S	Y	R	S	T	Y	I	I	150	
UL33-1b HCMV #767	101	S	V	T	S	C	K	F	L	S	V	I	Y	Y	S	S	C	T	V	G	F	A	T	V	A	L	I	A	A	D	R	Y	R	V	L	H	K	R	T	Y	A	R	Q	S	Y	R	S	T	Y	I	I	150	
UL33-1b HCMV #747	101	S	V	T	S	C	K	F	L	S	V	I	Y	Y	S	S	C	T	V	G	F	A	T	V	A	L	I	A	A	D	R	Y	R	V	L	H	K	R	T	Y	A	R	Q	S	Y	R	S	T	Y	I	I	150	
UL33-2 HCMV Toledo	100	G	V	A	S	C	K	F	L	S	V	I	Y	Y	S	S	C	T	V	G	F	A	T	V	A	L	I	A	A	D	R	Y	R	V	L	H	K	R	T	Y	A	R	Q	S	Y	R	S	T	Y	T	I	149	
UL33-2 HCMV #933	100	G	V	A	S	C	K	F	L	S	V	I	Y	Y	S	S	C	T	V	G	F	A	T	V	A	L	I	A	A	D	R	Y	R	V	L	H	K	R	T	Y	A	R	Q	S	Y	R	S	T	Y	T	I	149	
UL33-2 HCMV #1501	100	G	V	A	S	C	K	F	L	S	V	I	Y	Y	S	S	C	T	V	G	F	A	T	V	A	L	I	A	A	D	R	Y	R	V	L	H	K	R	T	Y	A	R	Q	S	Y	R	S	T	Y	T	I	149	
UL33-3 HCMV AD169	101	G	V	A	S	C	K	F	L	S	V	I	Y	Y	S	S	C	T	V	G	F	A	T	V	A	L	I	A	A	D	R	Y	R	V	L	H	K	R	T	Y	A	R	Q	S	Y	R	S	T	Y	M	I	150	
UL33-3 HCMV #1521	100	G	V	A	S	C	K	F	L	S	V	I	Y	Y	S	S	C	T	V	G	F	A	T	V	A	L	I	A	A	D	R	Y	R	V	L	H	K	R	T	Y	A	R	Q	S	Y	R	S	T	Y	M	I	149	
UL33-4 HCMV #903	101	S	V	S	S	C	K	F	L	S	V	V	I	Y	Y	S	S	C	T	V	G	F	A	T	V	A	L	I	A	A	D	R	Y	R	V	L	H	K	R	T	Y	A	R	Q	S	Y	R	S	T	Y	I	V	150

	TM4					ES2					TM5																																								
UL33-1a HCMV Merlin	151	L	L	L	T	W	F	A	G	L	I	F	S	M	P	A	A	V	Y	T	T	V	V	I	H	N	G	T	N	G	-	Q	S	S	N	G	H	A	T	C	V	L	Y	F	I	A	E	V	Y	T	199
UL33-1a HCMV #1506	151	L	L	L	T	W	F	A	G	L	I	F	S	M	P	A	A	V	Y	T	T	V	V	I	H	N	G	T	N	G	-	Q	S	S	N	G	H	A	T	C	V	L	Y	F	I	A	E	V	Y	T	199
UL33-1a HCMV #1409	151	L	L	L	T	W	F	A	G	L	I	F	S	M	P	A	A	V	Y	T	T	V	V	I	H	N	G	T	N	G	-	Q	S	S	N	G	H	A	T	C	V	L	Y	F	I	A	E	V	Y	T	199
UL33-1b HCMV Towne	151	L	L	L	T	W	F	A	G	L	I	F	S	M	P	A	A	V	Y	T	T	V	V	I	H	N	G	T	D	-	-	E	N	T	N	G	H	A	T	C	V	L	Y	F	I	A	E	V	Y	T	198
UL33-1b HCMV #767	151	L	L	L	T	W	F	A	G	L	I	F																																							

Abbildung 3.13, fortgesetzt

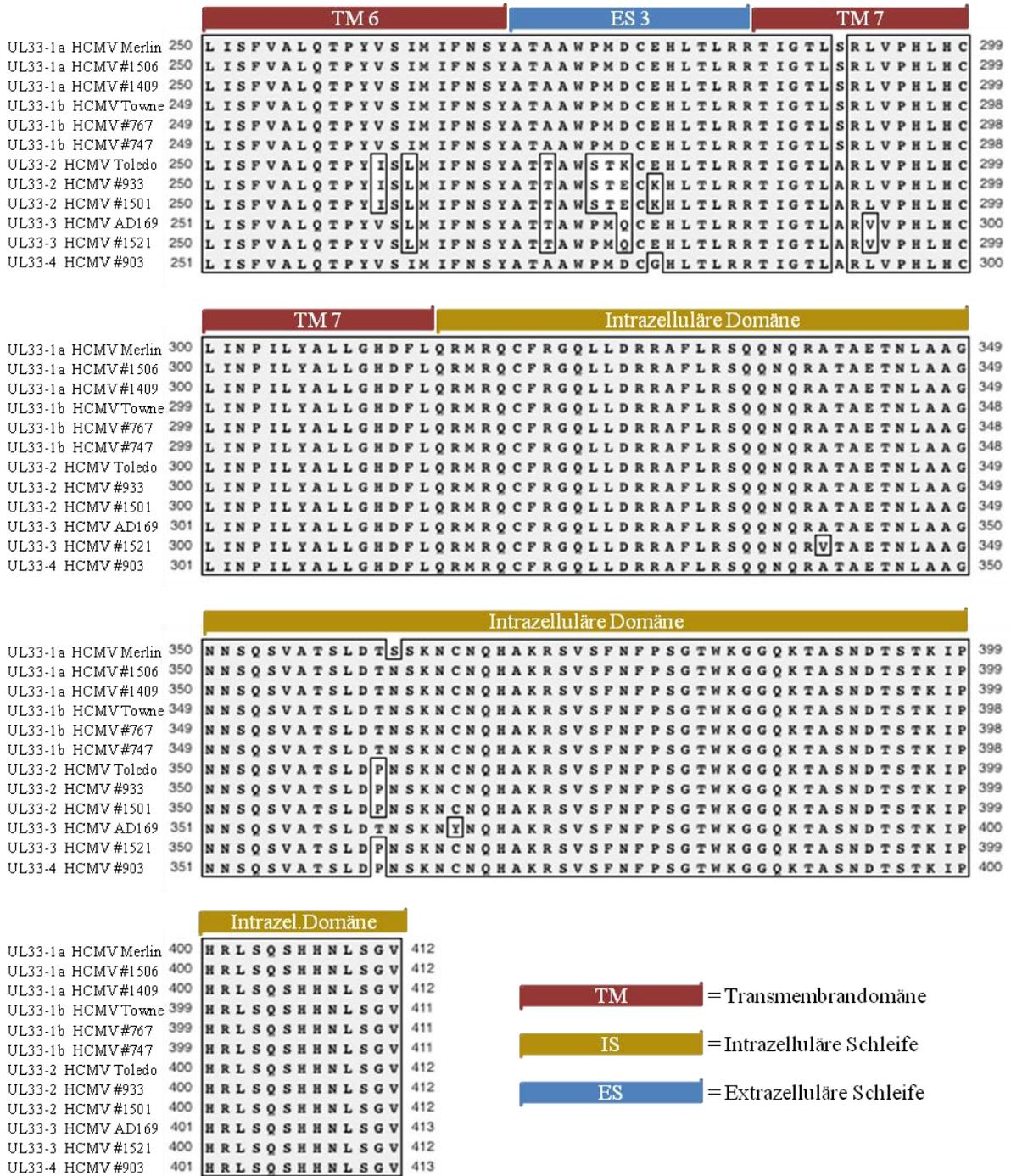


Abbildung 3.13: Alignment der UL33-Genotypen 1-4 mit Darstellung der vermuteten Proteinabschnitte des GPCR. Das alignment basiert auf den translatierten Nukleinsäuresequenzen des gesamten, gespleißten UL33-Gens. Stamm Merlin Acc.-no. AY446894; Stamm Towne Acc.-no. AY315197; Stamm Toledo Acc.-no. AY486470; Stamm AD169 Acc.-no. X17403; Sequenzen aus dieser Arbeit werden mit „#“ + Probennummer aufgeführt. Alignment generiert in MacVector. Proteinstruktur-Prädiktion mittels des Split-4-Servers, siehe Abschnitt 3.3.4.

3.3.5 Detektierte Genotypen der Untersuchung von Humanproben

Es wurden 65 Humanproben auf ihre gB- und UL33-Genotypen untersucht. Initial erfolgte die Untersuchung der Proben mittels der etablierten PCR-Systeme für gB und UL33 ohne Einsatz von LNA. Der in einer Probe ohne LNA-Zusatz amplifizierbare Genotyp wurde als prominenter Genotyp einer Probe bezeichnet. In mischinfizierten Proben konnte nachfolgend bei erneuter Amplifikation in Gegenwart des antisense LNA-Oligonukleotids gegen den prominenten Genotypen der 2. Genotyp amplifiziert werden. Bei weiterer Untersuchung konnte auch ein 3. beziehungsweise ein 3. und 4. Genotyp nachgewiesen werden (Tab. 3.6). Für alle Proben wurde das Vorkommen weiterer Genotypen durch PCR mit LNA ausgeschlossen. Proben, in denen der gB-Genotyp 5 beziehungsweise UL33-Genotyp 4 nachgewiesen wurde, konnten nicht auf weitere Genotypen untersucht werden, da keine spezifischen LNA gegen diese Genotypen vorlagen (betrifft Humanproben 445, 462 und 903).

Von 65 humanen Proben konnten in 27 Proben keine Amplifikate zur Genotypisierung erzeugt werden. Von den 27 nicht genotypisierten Proben stammten 19 Proben aus Nigeria von AIDS-Patienten, bei denen in Voruntersuchungen des DNA-Polymerase-Gens kein HCMV nachgewiesen werden konnte. Acht Proben (17%) der insgesamt 46 untersuchten HCMV-positiven Proben konnten in dieser Arbeit nicht genotypisiert werden.

38 Proben wurden entweder in gB, UL33 oder beiden Genbereichen genotypisiert. Davon stammten 30 Proben von immunsupprimierten Patienten. Weitere Angaben zu den detektierten Genotypen beziehen sich auf diese Patientengruppe.

Von 25 gB-genotypisierten Proben wurden in 15 Proben jeweils nur ein gB-Genotyp, in 8 Proben jeweils zwei Genotypen und in jeweils einer einmal drei und einmal vier Genotypen nachgewiesen. Von 27 UL33-genotypisierten Proben Immunsupprimierter zeigte sich in 19 Proben nur ein UL33-Genotyp, in 8 Proben wurden jeweils zwei Genotypen ermittelt.

Allgemein ausgedrückt weisen 40% der Proben immunsupprimierter Patienten mehr als einen gB-Genotyp und 30% zwei UL33-Genotypen auf.

In Tabelle 3.6 sind die in den 38 genotypisierten Proben detektierten gB- und UL33-Genotypen aufgelistet, Proben nicht Immunsupprimierter sind grau schattiert und haben die Probennummern 747, 903, 926, 927, 932, 933, 934 und 1297.

Ergebnisse

Proben- nummer RKI	Klinik	Promi- nenter / 1. gB- Typ	2. gB- Typ	3. gB- Typ	4. gB- Typ	5.gB- Typ	Promi- nenter / 1. UL33-	2. UL33- Typ	3. UL33- Typ
344	AIDS-Patient, Lymphom	1	neg.				neg.		
445	AIDS-Patient	2	3	5	n.u.		2	3	neg.
446	AIDS-Patient	neg.					2	1	neg.
456	AIDS-Patient	neg.					2	3	neg.
459	AIDS-Patient	2	3	neg.			3	neg.	
462	AIDS-Patient	5	n.u.				2	1	neg.
463	AIDS-Patient	neg.					3	1	neg.
465	AIDS-Patient	4	1	neg.			3	neg.	
468	AIDS-Patient	1	neg.				2	neg.	
472	AIDS-Patient	1	4	2	3	neg.	3	1	neg.
668	Lymphom (posttransplantations-)	1	2	neg.			1	neg.	
747	Mammakarzinom	1	neg.				1	neg.	
766	lymphoproliferative Erkrankung	3	neg.				1	neg.	
767	lymphoproliferative Erkrankung	1	3	neg.			1	neg.	
779	Lymphom (posttransplantations-)	3	neg.				1	neg.	
780	Lymphom (posttransplantations-)	1	neg.				neg.		
798	AIDS-Patient, Lymphom	3	1	neg.			1	neg.	
903	unklare Blutarmut	3	neg.				1	4	n.u.
926	Zellkultur	1	neg.				neg.		
927	Zellkultur	1	neg.				1	neg.	
932	Zellkultur	3	neg.				2	neg.	
933	Zellkultur	3	neg.				2	neg.	
934	Zellkultur	3	neg.				1	neg.	
1292	Lymphom (Chronisch Lymphatische Leukämie)	1	neg.				1	neg.	
1297	Normalbefund	1	neg.				2	neg.	
1413	lymphoproliferative Erkrankung (ped.)	3	neg.				2	neg.	
1414	Nierentransplantatempfänger; CMV-Reaktivierung	1	3	neg.			1	2	neg.
1486	lymphoproliferative Erkrankung (ped.)	1	neg.				neg.		
1487	lymphoproliferative Erkrankung (ped.)	1	neg.				1	neg.	
1488	lymphoproliferative Erkrankung (ped.)	4	3	neg.			1	neg.	
1489	lymphoproliferative Erkrankung (ped.)	1	neg.				1	neg.	
1490	lymphoproliferative Erkrankung (ped.)	3	neg.				1	neg.	
1491	lymphoproliferative Erkrankung (ped.)	1	neg.				1	neg.	
1492	lymphoproliferative Erkrankung (ped.)	neg.					1	neg.	
1493	lymphoproliferative Erkrankung (ped.)	1	neg.				1	neg.	
1494	lymphoproliferative Erkrankung (ped.)	1	neg.				1	neg.	
1495	lymphoproliferative Erkrankung (ped.)	neg.					1	neg.	
1498	Kombinierter Immundefekt	3	4	neg.			1	2	neg.

Tabelle 3.6: Auflistung von 38 Humanproben mit in den Proben bestimmten gB- und UL33-Genotypen. Die Spalten geben für die einzelnen Proben die Reihenfolge der Detektion der aufgeführten Genotypen an. gB-Genotypen 1 – 5 (Chou *et al.* 1991; Shepp *et al.*, 1998) beziehungsweise UL33-Genotypen 1 – 4 (Einteilung laut dieser Arbeit, siehe Abschnitt 3.3.3). Da sowohl für gB-Typ 5 als auch für UL33-Typ 4 keine antisense LNA Oligonukleotide zur Verfügung stehen, konnte bei den betroffenen Proben das Vorkommen weiterer Genotypen nicht ermittelt werden. ped. = pädiatrisch; neg. = negativ; n.u. = nicht untersucht. Grau schattiert: Zellkulturen und Proben nicht immunsupprimierter Patienten.

Tabelle 3.7 fasst die detektierten Genotypen noch einmal zusammen. Dargestellt sind die absoluten Häufigkeiten der erfassten Genotypen in der Gruppe immunsupprimierter Patienten mit und ohne LNA-Einsatz. Insgesamt wurden für gB 25 Genotypen durch PCR bestimmt, unter Verwendung von LNA konnten insgesamt 38 Genotypen detektiert werden, dies entspricht rechnerisch durchschnittlich 1,5 Genotypen pro genotypisierte Humanprobe. Analog sind für

Ergebnisse

UL33 bei 27 durch PCR detektierten Genotypen unter Verwendung von LNA insgesamt 35 Genotypen erfasst worden. Dies entspricht einer rechnerischen durchschnittlichen Belastung von 1,3 Genotypen je genotypisierter Humanprobe. Abbildung 3.14 stellt die Häufigkeiten der mittels PCR und LNA detektierten Genotypen für gB und UL33 graphisch dar.

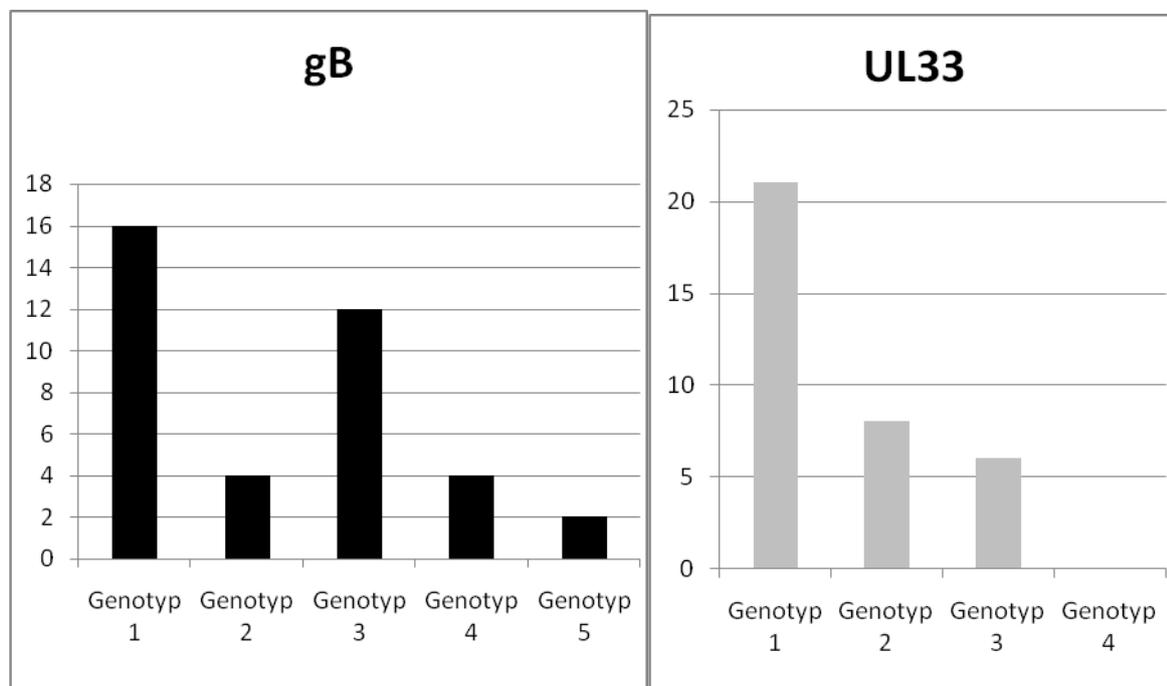


Abbildung 3.14: Graphische Darstellung der absoluten Häufigkeiten der gB- und UL33-Genotypen aus Proben immunsupprimierter Patienten. Die Genotypisierung erfolgte mittels PCR und LNA bei insgesamt 30 Proben immunsupprimierter Patienten. Die Zuordnung der amplifizierten Sequenzen erfolgte durch Sequenzierung und Vergleich mit den etablierten gB-Genotypen 1 – 5 (Chou *et al.* 1991; Shepp *et al.*, 1998) beziehungsweise UL33-Genotypen 1 – 4 (Einteilung laut dieser Arbeit). UL33-4 konnte in keiner der Proben nachgewiesen werden.

Gen	Positive Proben	Genotyp 1	Genotyp 2	Genotyp 3	Genotyp 4	Genotyp 5	Insgesamt detektierte Genotypen:
gB	25	16	4	12	4	2	38
davon ohne LNA detektiert:	25	14	2	6	2	1	25
UL33	27	21	8	6	0	n.a.	35
davon ohne LNA detektiert:	27	17	6	4	0	n.a.	27

Tabelle 3.7: Tabellarische Darstellung der absoluten Häufigkeiten der gB- und UL33-Genotypen aus Proben immunsupprimierter Patienten. Die absoluten Häufigkeiten sind jeweils mit und ohne Berücksichtigung der unter LNA-Einsatz detektierten Genotypen angegeben. Die Zuordnung der amplifizierten Sequenzen erfolgte durch Sequenzierung und Vergleich mit den etablierten gB-Genotypen 1 – 5 (Chou *et al.* 1991; Shepp *et al.*, 1998) beziehungsweise UL33-Genotypen 1 – 4 (Einteilung laut dieser Arbeit). n.a. = nicht anwendbar.

Ergebnisse

HCMV	gB-Genotyp	UL33-Genotyp #
Stamm Merlin	1	1
Stamm TB/40 E	1	3
Stamm AD169	2	3
Stamm Toledo	3	2
Stamm Towne	4	1
Isolat 1637-92 *	5	unbekannt
Humanproben; n=8	1	1
Humanproben; n=2	1	2
Humanproben; n=4	3	1
Humanproben; n=3	3	2
Humanprobe 462 §	2, 3, 5	1 und 2
Humanprobe 903 §	3	1 und 4

Tabelle 3.8: Kookkurrenzen von gB- und UL33-Genotypen. Aufgeführt sind gB- und UL33-Genotypen von komplett sequenzierten HCMV-Stämmen aus der GenBank sowie die Kookkurrenzen von Genotypen der beiden Genbereiche aus untersuchten Humanproben dieser Arbeit. Stamm TB/40 E: Acc.-No. EF999921; alle anderen Stämme mit Acc.-No. siehe Abbildungstext 3.13. # = Benennung der UL33-Genotypen nach der Einteilung dieser Arbeit; * = gB-5 nach Shepp *et al.*, 1998; § = mehrfach infizierte Proben aus dieser Arbeit.

3.3.6 Genetische Kopplung von gB und UL33

Die in dieser Arbeit entwickelte Methodik ermöglicht eine Genotypisierung von HCMV in den Genen gB und UL33 und damit den Nachweis beziehungsweise Ausschluss einer genetischen Kopplung von gB und UL33. Mittels PCR konnte bei insgesamt 17 Humanproben nur je ein gB- und UL33-Genotyp nachgewiesen werden. Davon wiesen acht Proben gB-1 und UL33-1, vier Proben gB-3 und UL33-1, drei Proben gB-3 und UL33-2 und zwei Proben gB-1 und UL33-2 auf (Tabelle 3.8). In Probe 903 ließ sich sowohl UL33-1 als auch UL33-4 detektieren, sowie gB-3. Somit wurde davon ausgegangen, dass einer der vorkommenden CMV dieser Probe die Genotypenkonfiguration UL33-4 und gB-3 aufweist. Der begleitende UL33-Genotyp zu gB-5 konnte nicht zugeordnet werden, da in der Probe 462 sowohl UL33-1 als auch UL33-2 nachgewiesen wurden. Diese Daten ergeben keinen Hinweis auf eine genetische Kopplung von gB- und UL33-Genotypen.

3.4 Ergebnisse der PCR-Testung an Tierproben

Im Rahmen der Evaluation der Methodik des gB- und UL33-Primersystems sollte die Universalität der PCR an nicht-humanen Primaten-CMV untersucht werden. Hierbei wurden insgesamt sieben tierische Proben untersucht. In drei Proben konnte keine Sequenz erzeugt

Ergebnisse

werden, in vier Proben gelang die Amplifikation und Sequenzierung von Primaten gB beziehungsweise UL33 (Tab. 3.9). In zwei Proben aus *Pan troglodytes* und einer Probe aus *Gorilla gorilla* konnte das gB-Primersystem spezifische Amplifikate erzeugen. Probe Ptro3147 zeigte die bereits von Dolan *et al.* (2004) publizierte Sequenz von gB aus Schimpansen-CMV. Zusätzlich wurde in der Probe Ptro4695 eine Sequenz aus *Pan troglodytes* sequenziert, die deutlich von der bisher bekannten abweicht (B. Ehlers und M. Deckers, unpubliziert). Zudem wurde eine gB-Sequenz aus *Gorilla gorilla* (Probe Ggor5050) amplifiziert (B. Ehlers und M. Deckers, unpubliziert). Für Gorillas lagen bisher noch keinerlei CMV-Sequenzdaten vor. Durch Einsatz des UL33-Primersystems konnte eine UL33-Sequenz aus *Pan troglodytes* erzeugt werden. Diese deckt sich weitgehend mit der von Dolan *et al.* (2004) bestimmten UL33-Sequenz aus Schimpansen-CMV.

Probe	Spezies	gB	UL33
Ptro3147	<i>Pan troglodytes</i>	Analog zur Sequenz aus Dolan et al., 2004	negativ
Ptro3148	<i>Pan troglodytes</i>	n.u.	Analog zur Sequenz aus Dolan et al., 2004
Ptro4695	<i>Pan troglodytes</i>	neuartige Sequenz	n.u.
Ggor5050	<i>Gorilla gorilla</i>	neuartige Sequenz	n.u.

Tabelle 3.9: Übersicht über erfolgte Amplifikat- und Sequenzerzeugungen aus nicht-humanen Primaten-CMV. n.u. = nicht untersucht.

4. Diskussion

4.1 PCR-Systeme für gB (UL55) und UL33

HCMV ist ein wichtiger Krankheitserreger des Menschen und hat die Fähigkeit verschiedene Organsysteme und Zelltypen zu infizieren. HCMV besitzt eine große Anzahl von Oberflächenmolekülen wie Rezeptoren, die unter anderem Virus-Zellanlagerung und Eintritt vermitteln (Compton, 2004). Bei diesen Oberflächenmolekülen handelt es sich oft um Gene mit Polymorphismen. Inwiefern einzelne Genotypen polymorpher Oberflächenproteine mit einem distinkten Zelltropismus oder Krankheitsverlauf assoziiert sind, ist Gegenstand langjähriger Forschung und wird kontrovers diskutiert (Pignatelli *et al.*, 2004). Eine weitere Relevanz der Polymorphie der Oberflächenproteine besteht bei Entwicklung aktiver Impfstoffe gegen HCMV. Bei aktiver Immunisierung mit Oberflächenproteinen sollte die Immunisierung derart erfolgen, dass eine Kreuzimmunität zu anderen Genotypen des sensibilisierten Oberflächenproteins besteht.

Aus diesen Gründen ist der Nachweis von HCMV-Gen-Polymorphismen von großer Bedeutung. Bei dem PCR-basierten Nachweis solcher Gene muss eine Primeranlagerung im oder um den polymorphen Genbereich erfolgen. Hierbei besteht die Gefahr, dass unbekannt divergente Sequenzvarianten nicht amplifiziert werden können, da die Primer sich nicht anlagern können. Daher ist bei PCR-Nachweis polymorpher Gene eine Primerbindung in hochkonservierten (beispielsweise auch in nicht-humanen Primaten-CMV vorkommenden) Genbereichen mit degenerierten Primern sinnvoll. Für gB, ein CMV-Oberflächenprotein, ist bisher kein solches PCR-System publiziert (siehe Abschnitt 1.3.3). Jedoch spielt gB eine entscheidende Rolle bei Virusanlagerung und Viruseintritt und ist Gegenstand von Phase-3-Studien für aktive Impfung (Schleiss, 2005). Ein Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer Methodik zur sicheren Detektion auch hochdivergenter gB-Genotypen.

Nachfolgend sollte für das HCMV-Gen UL33, bei welchem Hinweise auf genetische Variabilität bestehen, ebenfalls ein PCR-System mit degenerierten Primern und Primerbindung in hochkonservierten Genbereichen entwickelt werden. Bei einer *in silico* Untersuchung von Dolan *et al.* (2004) konnte eine nichtsynonyme Divergenz von ca. 0,5 Ka zwischen den Stämmen Merlin, AD169 und Toledo nachgewiesen werden (siehe Abb. 1.4). Für UL33 liegen derzeit keine publizierten molekularen Untersuchungen zu genotypischer Variabilität vor. UL33 kodiert für einen GPCR. Viruskodierte GPCR spielen eine Rolle bei Immunevasion, zellulärer

Transformation durch Onkoviren, Zelltropismus und vielleicht beim Zelleintritt. Somit kodiert UL33 ein prinzipiell potentes virales Protein, dessen Polymorphismus möglicherweise funktionelle Auswirkungen auf den GPCR und damit den Ablauf von CMV-Infektionen haben kann.

Untersuchungen der Prävalenz von Genotypen belegen, dass oftmals Mehrfachinfektionen mit mehreren Genotypen eines Virus vorliegen, vor allem bei immunsupprimierten Patienten. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass bis zu 28,8% der untersuchten Patientenproben Mehrfachinfektionen mit verschiedenen HCMV-gB-Typen aufweisen (Tarrago *et al.*, 2003). Klassische, undegenerierte, generische PCR-basierte Diagnostik kann jedoch bei Mehrfachinfektionen nur die Genotypen mit der höchsten Viruslast nachweisen.

Zur Detektion mehrerer Herpesviren in einer Probe setzten Prepens *et al.* (2007) spezifische DNA-LNA antisense-Oligonukleotide ein, welche die Amplifikation von bekannten Herpesviren in nicht-humanen Primatenproben spezifisch ausschließen konnten. Diese Inhibition einzelner Herpesviren ermöglichte die Amplifikation von bis dahin unbekanntem Herpesviren mittels einer degenerierten nested-PCR. Zur Detektion von gB- und UL33-Mehrfachinfektionen sollten analog zur Arbeit von Prepens *et al.* antisense LNA-Oligonukleotide eingesetzt werden. Hierbei kamen rein LNA-basierte Oligonukleotide zum Einsatz, um spezifisch einzelne Genotypen von der Amplifikation durch die PCR auszuschließen.

4.1.1 PCR-Sensibilität und Untersuchung von CMV nicht-humaner Primaten

Für beide zu untersuchende Genbereiche konnten nested-PCR-Systeme entwickelt werden, die durch nachfolgende Sequenzierung der Amplifikate die Bestimmung des gB- beziehungsweise UL33-Genotyps erlauben. Sowohl die gB-PCR als auch die UL33-PCR stellte sich als hochsensitiv heraus. Im Rahmen der Modellversuche mit artifiziellen Matrizen zeigte die alleinige Amplifikation mittels der äußeren Primer der nested-PCR bereits eine hohe Sensitivität. So war es möglich, noch 10 Kopien der als Matrize vorgelegten DNA-Fragmente mit den jeweiligen äußeren Primerpaaren der gB- beziehungsweise UL33-PCR nachzuweisen.

Es konnten bei Untersuchungen mittels der nested-PCR in Humanproben mit weniger als 6000 Genomkopien / ml gB-Sequenzen und Humanproben mit < 2000 Genomkopien / ml UL33-Sequenzen erzeugt werden (nicht gezeigte Daten). Im Rahmen der Probenuntersuchung konnte oftmals nach der ersten PCR-Runde noch kein PCR-Produkt per Gelelektrophorese nachgewiesen werden, jedoch nach Ablauf der zweiten PCR-Runde. Somit fand bei der Untersuchung von Proben generell eine Amplifikation über zwei Runden statt.

Die UL33-nested-PCR erlaubte durch Positionierung der Primerbindungsstellen in den relativ unvariablen Nachbargenen UL32 und UL34 die Amplifikation des gesamten UL33-Gens auch bei hochvariablen UL33-Sequenzen, wie durch die Amplifikation von UL33 aus Schimpansen-CMV gezeigt werden konnte (siehe Abschnitt 3.4). Im Gegensatz zu den Voruntersuchungen an artifiziellen Matrizen konnte bei der Untersuchung von Humanproben, vor allem aber auch bei der Untersuchung von CMV anderer Primaten, vereinzelt nur Amplifikat unzureichender Menge durch die nested-PCR erzeugt werden, so dass eine Sequenzierung nicht durchgeführt werden konnte. Da das Produkt der UL33-nested-PCR mehr als 1,8 kBp umfasst, könnte die Verwendung einer „long-distance-polymerase“ eine der Taq-Polymerase überlegene Amplifikationseffizienz aufweisen und mehr Genotypisierungen erlauben. Die Vielseitigkeit der gB-nested-PCR überzeugte durch Amplifikation von verschiedenen bekannten und neuartigen Sequenzen aus Schimpansen und Gorillas (siehe Abschnitt 3.4; B. Ehlers und M. Deckers, unpubliziert). Aufgrund dieser positiven Ergebnisse bei Untersuchungen von Primaten-CMV wird davon ausgegangen, dass beide PCR-Systeme unbekannte, hochdifferente HCMV-Genotypen detektieren können. Die weitere Untersuchung und Beschreibung der hier erzeugten, bisher unbekannt Primaten-Sequenzen war nicht Gegenstand dieser Arbeit. Zusammenfassend konnten für beide Genbereiche PCR-Systeme mit sehr guter Sensitivität und Universalität etabliert werden, um Sequenzen zur CMV-Genotypisierung zu erzeugen.

4.2 Selektive PCR-Amplifikation von HCMV-Genotypen durch LNA

Mehrfachinfektionen mit mehreren humanen Herpesviren und deren Genotypen sind häufig und betreffen vor allem immunsupprimierte Patienten (Griffiths *et al.*, 1999). HCMV-Infektion führt vor allem bei herabgesetzter Immunität zu schwerwiegenden Organinfektionen, wobei das Vorkommen multipler HCMV-Stämme möglicherweise die Pathogenität der HCMV-Infektion weiter erhöht (Coaquette *et al.*, 2004).

Zum Nachweis von Mehrfachinfektionen wurden in dieser Arbeit antisense-Oligonukleotide aus locked nucleic acids (LNA) eingesetzt. Diese inhibieren spezifisch bereits nachgewiesene Genotypen von der Amplifikation durch die Polymerase und erlauben damit die PCR-Amplifikation weiterer in der Probe vorkommender Genotypen. LNA besitzen aufgrund eines fixierten Zuckerrestes eine der DNA und RNA überlegene Hybridisierungseigenschaft und eignen sich daher besonders als antisense-Oligonukleotide. Die Eignung von LNA-Basen zur Synthese von antisense-Oligonukleotiden beruht auf der verbesserten Basenfehlpaarungs-Diskriminierung. You *et al.* (2006) untersuchten die Basenfehlpaarungs-Diskriminierung von

Diskussion

LNA-substituierten Oligonukleotiden systematisch und empfahlen eine Substitution von nicht mehr als vier Basen pro Oligonukleotid. Komplette LNA-substituierte Oligonukleotide wurden nicht untersucht und es wurde vermutet, dass diese eine zu hohe Bindungsaffinität besitzen, um als antisense-Oligonukleotide zu taugen. Hingegen liegen Untersuchungen vor, dass auch komplett LNA-basierte Oligonukleotide eine A-Typ-Helix aufweisen und damit die für die Anlagerung an komplementäre Stränge notwendige Sekundärstruktur besitzen (Petersen *et al.*, 2003; Nielsen *et al.*, 2004; You *et al.*, 2004).

In der vorliegenden Arbeit kamen vollständig substituierte Oligonukleotide zum Einsatz. Nur bei der UL33-2-LNA wurde auf die LNA-Substitution von zwei Basen verzichtet. Insgesamt wurden sieben Oligonukleotide aus 12 - 16 LNA-Basen (Tab. 2.2) eingesetzt. Im Rahmen der Modellversuche mit artifiziellen Matrizen konnte für alle gB-LNA bei Durchführung nur einer PCR-Runde eine Inhibition der Amplifikation des entsprechenden gB-Genotyps um den Faktor 100 beobachtet werden (siehe Abschnitt 3.2.2). Ein Modellversuch zur Beurteilung der gB-LNA-Inhibitionsfaktoren bei Durchführung der nested-PCR unter LNA-Zugabe in beiden Runden konnte nicht ausgewertet werden, da es zu Doppelbanden (um ca. 500 Bp Länge) und widersprüchlichen Ergebnissen kam (stärkere Zweitrunden-Amplifikate unter LNA-Zusatz im Vergleich zu keinem LNA-Zusatz). Inwiefern das Auftreten unspezifischer Amplifikate der artifiziellen Matrizen (die auch schon in dem gB-LNA-Modellversuch über eine Runde zu Anwendung kamen) durch Einsatz des inneren gB-PCR-Primers verursacht wird, ist unklar. Zur weiteren experimentellen Untersuchung der gB-LNA-Inhibitionsfaktoren der gB-nested-PCR wäre die Verwendung von anderen Matrizen wie z.B. vollständigen HCMV-Genomkopien sinnvoll. Somit sind für den Einsatz der LNA in beiden Runden der nested-PCR, wie er im Rahmen der Untersuchung von Humanproben erfolgte, keine Inhibitionsfaktoren bestimmt worden.

Wiederholt konnte in einem Modellversuch eine unspezifische Wechselwirkung der gB-3-LNA festgestellt werden. Diese inhibiert die Amplifikation der gB-2-Matrize um den Faktor 10 (siehe Abschnitt 3.2.2, Abbildung 3.8 D). Auf Sequenzebene liegen keine Hinweise für eine mögliche Wechselwirkung vor, insgesamt bestehen sechs Basenfehlpaarungen zwischen der gB-3-LNA und dem entsprechenden Abschnitt von gB-2 (siehe Abb. 3.6). Weitere Experimente erfolgten mit der gB-3-LNA und *de facto* konnte in keiner Humanprobe gB-2 bei Zugabe der gB-3-LNA detektiert werden. Darüber, ob gB-2 in mehrfachinfizierten Proben vermindert detektiert wurde, kann keine Aussage gemacht werden. Es muss aber von einer zu geringen Detektion von gB-2 ausgegangen werden. Für weitergehende Untersuchungen wäre die Verwendung einer alternativen gB-3-LNA sinnvoll.

Insgesamt konnten LNA erfolgreich zur Inhibition der Amplifikation von Genotypen und damit zur Detektion von Mehrfachinfektionen eingesetzt werden. Auf eine ausführliche Untersuchung der Inhibitionsfaktoren von den UL33-LNA wurde verzichtet, da in einem ersten Modellversuch alle drei LNA eine spezifische Inhibition der UL33-Genotypen zeigten (nicht aufgeführte Daten). Der Anteil an nachgewiesenen HCMV-Mehrfachinfektionen übertrifft mit 40% die der bereits vorliegenden Untersuchungen (vor allem jene mit geeigneten Methoden für den Nachweis von Mehrfachinfektionen wie von Coquette *et al.*, 2004; Tarrago *et al.*, 2003) und zeugt von einer umfassenden Detektion der vorliegenden Mehrfachinfektionen. Für den Einsatz komplett substituierter Oligonukleotide mit 12 - 16 LNA-Basen konnte gezeigt werden, dass diese als spezifische antisense-Oligonukleotide dienen. Somit stellen die in dieser Arbeit entwickelten Auswahlkriterien für LNA-Bindungsstelle und der Einsatz von komplett substituierten LNA eine neuartige Möglichkeit dar, um spezifisch in degenerierte PCR inhibierend einzugreifen. Es bedarf weiterer Untersuchungen analog zu der Arbeit von You *et al.* (2006), die die Bindungseigenschaften von LNA-basierten antisense-Oligonukleotiden systematisch testen und dabei auch komplett LNA-substituierte Oligonukleotide mit einbeziehen.

4.3 Genotypisierung von Humanproben

Durch nested-PCR mit LNA-Zusatz und anschließender Sequenzierung wurden Humanproben, überwiegend von immunsupprimierten Patienten (siehe Tab. 2.3), auf die vorkommenden Genotypen untersucht. Von 65 Humanproben konnte in 27 Proben weder ein gB- noch ein UL33-Genotyp bestimmt werden. Davon war in 19 Proben bisher noch kein HCMV nachgewiesen worden, bei acht Proben war es mit anderen PCR-Systemen gelungen, HCMV-Sequenzen aus dem DNA-Polymerase-Gen zu amplifizieren. So konnte bei 38 von 46 HCMV-positiv bewerteten Proben (78%) eine Genotypisierung vorgenommen werden (siehe Tab. 3.6). Eine Genotypenbestimmung für sowohl gB als auch UL33 erfolgte bei 27 Proben (59%). Bei den HCMV-positiven Proben, die nicht genotypisiert werden konnten, gelang keine Amplifikation mittels PCR. Da sowohl das gB- als auch das UL33-nested-PCR-System eine hohe Sensitivität besitzt, muss es sich hierbei vor allem um Proben mit extrem geringer CMV-Last gehandelt haben, die nur mit PCR-Systemen zugänglich ist, welche sehr kurze Amplifikate erzeugen.

4.3.1 Glykoprotein B

Diverse Studien im Zeitraum von 1991 bis 2007 haben HCMV-positive Patientengruppen auf die vorkommenden gB-Genotypen untersucht. Hierbei zeigten sich keine reproduzierbaren

Diskussion

signifikanten Zusammenhänge zwischen gB-Genotypen der cleavage-site und klinischen Verläufen oder Ausgang der HCMV-Infektionen (siehe Tab. 1.2). Die methodischen Ansätze zur Detektion der gB-Genotypen waren zudem überwiegend nicht geeignet, divergente gB-Genotypen (wie beispielsweise gB-5) und auch Mehrfachinfektionen nachzuweisen (siehe Abschnitt 1.3.3).

In der vorliegenden Arbeit bestand keine Möglichkeit, Korrelationen zwischen der Art der Erkrankung und HCMV-Genotypen zu bestimmen, da eine zu geringe Probenzahl untersucht wurde (siehe Tab. 3.6). Jedoch konnte die Prävalenz der einzelnen Genotypen und des Anteils von Mehrfachinfektionen mit mehreren gB-Genotypen für eine Gruppe von 30 immunsupprimierten Patienten (in Deutschland lebende Kinder und Erwachsene mit lymphoproliferativen Erkrankungen und nigerianische Patienten mit AIDS) bestimmt werden.

Für diese Gruppe stellte sich der prozentuale Anteil der einzelnen gB-Genotypen an den insgesamt 38 detektierten Genotypen wie folgt dar: gB-1: 42% (16), gB-2: 11% (4), gB-3: 32% (12), gB-4: 11% (4) und gB-5: 5% (2) (Tab.3.7). Der Anteil von gB-2 an Mehrfachinfektionen könnte methodisch bedingt zu niedrig erfasst worden sein, da eine Inhibition von gB-2 durch die eingesetzte gB-3-LNA beobachtet worden war (betrifft 10 Proben, siehe Abschnitt 4.2 und Tab. 3.6). Ohne die Verwendung von LNA wurden nur die prominenten gB-Genotypen der 25 gB-positiven Proben nachgewiesen. Der prozentuale Anteil stellte sich wie folgt dar: gB-1: 56% (14), gB-2: 8% (2), gB-3: 24% (6), gB-4: 8% (2) und gB-5: 4% (1) (Tab.3.7). Der überwiegende Anteil bisheriger Studien konnte methodenbedingt nur die prominenten gB-Genotypen detektieren (siehe Abschnitt 1.3.4). Somit sind die o.g. Häufigkeiten besser für einen Vergleich mit bereits publizierten gB-Häufigkeitsverteilung geeignet. Pignatelli *et al.* (2004) haben in ihrer Übersichtsarbeit die Häufigkeiten der gB-Genotypen in größeren bis dahin publizierten Arbeiten zusammengefasst. Die hier nachgewiesene Verteilung der gB-Genotypen mit größter Häufigkeit von gB-1 (56%) gefolgt von gB-3 (24%) betrifft eine immunsupprimierte Gruppe von Patienten. Beispielsweise konnten Fries *et al.* (1994) für eine Gruppe von knochenmarkstransplantierten Patienten ebenfalls eine Prädominanz von gB-1(38%), gefolgt von gB-3 (25%), gB-2 (15%) und gB-4 (14%) feststellen. Jedoch zeigen weitere Studien aus anderen Ländern andere Häufigkeitsverteilungen für ähnliche Patientengruppen, so dass keine eindeutigen Aussagen über Prävalenzen getroffen werden können (Tab. 1.2; Pignatelli *et al.*, 2004).

13 Genotypen (entsprechend 34% aller detektierten Genotypen) wurden durch Einsatz von LNA in mehrfach infizierten Proben detektiert. Der in dieser Arbeit erfasste Anteil von mehrfach infizierten Proben an den gB-genotypisierten Proben beläuft sich auf 40%.

Nur einige der bisherigen Studien konnten die gB-Genotypen in mehrfachinfizierten Proben

vollständig erfassen oder versuchten dies. So untersuchten Aquino *et al.* (2000) eine Gruppe von Nierentransplantatempfängern. Sie verwendeten die Originalprimer nach Chou *et al.* (1991) und werteten mittels RFLP aus. Hierbei gab es anhand der Muster von Längenpolymorphismen in 25% der genotypisierten Proben Hinweise auf das Vorliegen von Mehrfachinfektionen. Tarrago *et al.* (2003) untersuchten AIDS-Patienten mit einer nested multiplex PCR, die spezifisch gB-1 bis 5 erfassen sollte. Bei den 70 untersuchten spanischen AIDS-Patienten fortgeschrittener Stadien konnte in 29% der Fälle multiple gB-Genotypen, jedoch kein einziger gB-5 nachgewiesen werden. Inwiefern hier die Detektion mittels multiplex-PCR unzulänglich war oder regionale Unterschiede bei der Verteilung von gB-Genotypen in immunsupprimierten Patienten bestehen, bleibt unklar (Zipeto *et al.*, 1998). Aquino *et al.* (2000) konnten außerdem zeigen, dass bei prospektiver Untersuchung (über 50 Wochen) einer Gruppe von Nierentransplantatempfängern bei 71% im Verlauf verschiedene gB-Genotypen nachweisbar sind. Coaquette *et al.* stellten 2004 eine Untersuchung von 92 immunsupprimierten Patienten (medikamentös immunsupprimierten Transplantatempfängern und Patienten mit lymphoproliferativen Erkrankungen) mit einer real-time-PCR und spezifischen Sonden für gB-Genotypen 1 - 4 vor. gB-Mehrfachinfektionen konnten bei 25,8% der Patienten festgestellt werden, und diese zeigten signifikant häufiger Transplantatabstoßung, hohe Viruslast und Koinfektionen mit anderen Herpesviren. Coaquette *et al.* empfahlen aufgrund ihrer Ergebnisse, chronisch immunsupprimierte Patienten routinemäßig auf gB-Mehrfachinfektionen zu testen, um diese dann antiviral zu behandeln. Aufgrund limitierter Daten wurde die Veröffentlichung von Coaquette *et al.* kontrovers diskutiert, und es wurde auf den Bedarf an weitergehenden Untersuchungen von gB-Mehrfachinfektionen und deren Auswirkungen hingewiesen (Crumpacker, 2004). Aufgrund der limitierten Probenzahl (n = 30) dieser Arbeit können die Prozentangaben über die Häufigkeiten der Mehrfachinfektionen nur orientierend zum Vergleich herangezogen werden. So zeigt die in dieser Arbeit angewandte Methodik einen für immunsupprimierte Patienten wesentlich höheren Anteil von Mehrfachinfektionen (40%) als in bisherigen Studien nachweisbar war (25% bis 29%, siehe oben).

In der aktuellen Literatur wurde über den Nachweis von gB-5 bisher nur bei acht HCMV berichtet, die aus AIDS-Patienten isoliert werden konnten (Shepp *et al.*, 1998). In der vorliegenden Arbeit konnte gB-5 in zwei nigerianischen Proben (Nr. 445 und 462) nachgewiesen werden. Beide Proben stammten ebenfalls von AIDS-Patienten. Die Sequenzierungsergebnisse deckten sich exakt mit der von Shepp *et al.* angegebenen Sequenz für gB-5. Die bereits publizierte Sequenz von Shepp *et al.* umfasst einen kurzen Abschnitt von 433 Bp im Bereich der cleavage-site. Aufbauend auf dieser Arbeit gelang Ehlers *et al.* die Amplifikation und Sequenzierung des

Diskussion

gesamten gB-5-Gens (siehe Abschnitt 3.3.1, Ehlers *et al.*, unpubliziert). Aufgrund der aberranten Sequenz von gB-5 konnte dieses mit den bisher gängigen Primersystemen nicht detektiert werden, Shepp *et al.* mussten zur Detektion einen der PCR-Primer nach Chou *et al.* (1991) austauschen. Die bis zu diesem Zeitpunkt alleinige Detektion von gB-5 bei Patienten mit AIDS führt zu der interessanten Frage, ob hier möglicherweise eine Interaktion zwischen HIV und CMV besteht oder ob das Vorkommen des gB-Genotypen durch die virale Immunsuppression bedingt ist (siehe Abschnitt 4.3.3).

Eine weitere Arbeit berichtete von der Detektion bisher unbekannter gB-Genotypen (Trincado *et al.*, 2000). Die so genannten gB-Typen 6 und 7 wurden in jeweils einem perinatal infizierten Kind nachgewiesen. Die publizierten Sequenzen aus dem Bereich der cleavage-site der beiden Genotypen zeigten jedoch nur geringe Varianten der Genotypen drei respektive eins. Insgesamt stellt sich das gB-Gen auch innerhalb der einzelnen gB-Genotypen mit kleinen Varianzen dar, die (wie bei gB-6 und -7) auf einigen wenigen Basenvariationen beruhen (nicht gezeigte Sequenzdaten).

Glykoprotein B ist Ziel neutralisierender Antikörper. Verschiedene pharmakologische Studien untersuchten die Eignung von gB für aktive Impfungen gegen HCMV. Die Glykoproteine gB und gH stellen außerdem Epitope dar, gegen die humane CD4 positive zytotoxische T-lymphozyten (CTL) gerichtet sind (Johnson *et al.*, 2002). Elkington *et al.* (2004) konnten zeigen, dass CTL-Antworten gegen konservierte Bereiche dieser Glykoproteine gerichtet sein müssen, da humane CTL nicht nur verschiedene genotypische Varianten von Glykoproteinen in Menschen erkennen können, sondern auch gB und gH anderer Primaten wie Schimpansen, Rhesusaffen und Paviane. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass humane CTL sogar Schimpansenzellen, welche Schimpansen-CMV-gB-Peptide auf der Zelloberfläche präsentieren, lysieren können (Elkington *et al.*, 2004). Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass die Variabilität des gB und gH trotz ihrer Funktion als Epitope für neutralisierende Antikörper nicht der Immunevasion zur Veränderung von Virusoberflächenepitopen dient, sondern dass die Variabilität dieser Glykoproteine für CMV in anderer Weise, z.B. für den Zelltropismus eine Rolle spielen könnte. Die Erkenntnisse der bisherigen funktionellen Untersuchungen von gB sind in Abschnitt 1.2.4 zusammengefasst. Der weit überwiegende Teil dieser funktionellen Untersuchungen erfolgte am Stamm AD169 mit dem Genotyp gB-2. Beispielhaft seien hier die Ergebnisse zu Interaktionen von gB mit epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor, toll-like Rezeptoren Typ-2 und β 1- und β 3- Integrinen sowie die gB-induzierte Zellfusion genannt (Wang *et al.*, 2003; Boehme *et al.*, 2006; Isaacson *et al.*, 2007; Kinzler *et al.*, 2005). Vergleichbare Arbeiten wurden für keinen anderen gB-Genotyp durchgeführt. Es gibt Hinweise, dass

funktionelle Eigenschaften von gB zumindest partiell auch durch den jeweiligen gB-Genotyp mitbestimmt werden, beispielsweise in Untersuchungen von Meyer-König *et al.* (1997): Bei durchflusszytometrischer Zellsortierung zeigte sich, dass das gB-1 im Gegensatz zu gB-2 und gB-3 in T-Lymphozyten *in vivo* nicht nachweisbar ist. Somit könnte gB-1 funktionell die CMV-Infektion von T-Lymphozyten ermöglichen, gB-2 jedoch nicht. Funktionelle Untersuchungen von gB sollten daher die Variabilität von gB berücksichtigen und die gB-Typen 1, 3, 4 und 5 mit einbeziehen. Zukünftige Studien von variablen CMV-Genen wie gB würden davon profitieren, auch den Nachweis von Mehrfachinfektionen zu ermöglichen. Der vorgestellte methodische Ansatz mit Verwendung einer degenerierten universellen PCR ist sinnvoll, um bisher unbekannte Genorte auf ihre Polymorphismen zu untersuchen. Trotz einiger Hinweise auf hochdivergente gB-Genotypen in nicht-humanen Primaten konnten bei der in dieser Arbeit untersuchten limitierten Probenzahl keine unbekannteren hochdifferenten humanen gB-Typen nachgewiesen werden.

Zum alleinigen Nachweis der bekannten gB-Genotypen ist die Nutzung einer spezifischen PCR sinnvoll. Hierbei scheinen multiplex Verfahren vorteilhaft, wobei die Sensitivität bei der Detektion von gB-5 und von mehreren gB-Genotypen in einer Probe bei bestehenden Verfahren noch überprüft werden sollte (Tarrago *et al.*, 2003).

4.3.2 UL33

UL33 kodiert einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor von HCMV, der an intrazellulären Organellen in infizierten Zellen nachweisbar ist (Fraile-Ramos *et al.*, 2002). Sequenzvergleiche von UL33 zeigen Ähnlichkeit zu humanen Chemokinrezeptoren, wobei bisher kein Ligand für UL33 identifiziert werden konnte (siehe Abschnitt 1.5.2). Die G-Protein Interaktionen und Pathway-Aktivierungen von UL33 sind in Tabelle 1.3 zusammengefasst (siehe auch Abschnitt 1.5.6). Alle in dieser Arbeit aufgeführten funktionellen Untersuchungen von UL33 erfolgten am Stamm AD169, der den Genotyp UL33-3 aufweist (unter anderem Casarosa *et al.*, 2003 b; Fraile-Ramos *et al.*, 2002; Margulies *et al.* 1996). Innerhalb der HCMV-Stämme weist UL33 die höchste Variabilität aller GPCR auf (Abbildung 1.4; Dolan *et al.*, 2004). Eine phylogenetische Untersuchung der bereits publizierten UL33-Sequenzen zeigte vier UL33-Genotypen, wobei bei einer Variabilität von 2,9% auf Aminosäureebene davon abgesehen wurde, die Genotypen aus Stamm Merlin und Towne als zwei distinkte Genotypen zu bezeichnen, sondern sie wurden als Varianten UL33-1a beziehungsweise UL33-1b bezeichnet (siehe Abschnitt 3.3.3). Die Variabilität zwischen den einzelnen UL33-Genotypen 1-3 liegt zwischen 5,3% und 9,7%, wobei

Diskussion

der in dieser Arbeit detektierte UL33-4 der divergenteste aller UL33-Genotypen ist, mit maximal 94.4% Identität zu Genotyp UL33-1b (siehe Tab. 3.5).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Gruppe von Proben immunsupprimierter Patienten (n = 30) auf das Vorkommen von UL33-Genotypen untersucht. Aufgrund der limitierten Probenzahl kann somit bei der Angabe von Häufigkeiten nicht von repräsentativen Häufigkeiten ausgegangen werden. Die prozentuale Häufigkeit der einzelnen UL33-Genotypen an den insgesamt 35 bestimmten Genotypen stellt sich folgendermaßen dar: UL33-1: 60% (21), UL33-2: 23% (8), UL33-3: 17% (6). UL33-4 konnte in keinem immunsupprimierten Patienten nachgewiesen werden. Somit ist zumindest für die in dieser Arbeit untersuchte Patientengruppe das funktionell meistuntersuchte UL33-3 aus AD169 ein eher seltener UL33-Genotyp.

In 30% der UL33-genotypisierten Proben konnten zwei Genotypen nachgewiesen werden. Damit zeigt sich für UL33 ein fast vergleichbarer Anteil von Mehrfachinfektionen wie für gB (40%), wobei keine Dreifach- beziehungsweise Vierfach-Infektionen detektiert werden konnten (vergleichend im Bereich des gB jeweils eine Probe mit einer Dreifach- und Vierfach-Infektion). Die Intergenotypenvariabilität im gB-Gen liegt zwischen 4,1% und 9% auf Aminosäureebene (siehe Tab. 3.4) und hat eine etwas geringere Varianz als das UL33-Gen (siehe oben).

Insgesamt zeigt UL33 eine deutliche Intergenotypenvariabilität und ein Vorkommen dieser einzelnen Genotypen in klinischem Probenmaterial, wobei die Häufigkeit des Nachweises für die bisher untersuchten immunsupprimierten Patienten von UL33-1 zu UL33-4 abnimmt. Immunsupprimierte Patienten erkranken besonders häufig und schwer an HCMV. Für diese Patientengruppe stellt das Vorkommen mehrerer HCMV-Genotypen wie der von UL33 ein entscheidendes Merkmal der HCMV-Infektion dar und könnte eine Rolle bei CMV-verursachten Organschädigungen spielen.

Die Variabilität von UL33 beschränkt sich auf bestimmte Genabschnitte. Ein vergleichendes alignment der in dieser Arbeit erzeugten, putativen Aminosäuresequenzen ausgewählter gespleißter UL33-Genotypen ist in Abbildung 3.13 dargestellt. Über dem alignment sind die einzelnen Abschnitte des GPCR nach Proteinstrukturberechnungen für UL33 angegeben. Hier besteht die Möglichkeit, konservierte und variable Bereiche zwischen den einzelnen Genotypen zu identifizieren und den einzelnen vermuteten Domänen des Rezeptors zuzuordnen. Demnach erscheinen die vermutlich intrazellulär gelegenen Rezeptoranteile sehr konserviert (siehe Abb. 3.13). Somit besteht bei den von den intrazellulären Domänen abhängigen Rezeptorfunktionen wie beispielsweise die G-Protein-Interaktion möglicherweise kein Anlass auf differenzielle funktionelle Untersuchung der einzelnen UL33-Genotypen.

Der Ort größter Variabilität scheint das extrazelluläre Ende von UL33 zu sein, welches von Exon

1 und dem beginnenden Exon 2 kodiert wird. Da dieser Anteil des Rezeptors maßgeblich die Zelllokalisierung des GPCR und dessen konstitutive Aktivität mitbestimmt, könnte es hier genotypenspezifische funktionelle Differenzen geben (Casarosa *et al.*, 2003a). Weiter stellt sich die zweite und dritte extrazelluläre Schleife als Ort großer Variabilität dar. Generell spielen die extrazellulären Schleifen 2 und 3 von Rhodopsin-Rezeptoren eine wesentliche Rolle bei der Erkennung und Interaktion mit Liganden (Mirzadegan *et al.*, 2003). Für UL33 ist bisher kein Ligand identifiziert worden. Bei der Suche nach gelösten oder membrangebundenen Liganden für UL33 sollten dementsprechend verschiedene UL33-Genotypen Berücksichtigung finden, wie beispielsweise auch der in dieser Arbeit relativ häufig nachgewiesene UL33-1, der im Stamm Merlin vorkommt.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass durch Sequenzvergleiche der Genotypen und Prädiktion der Proteinstruktur die vermutlich variablen Domänen des Rezeptors bestimmt werden konnten. Es steht somit für zukünftige funktionelle Untersuchungen von UL33 einerseits eine nested-PCR, die die Amplifikation des gesamten Gens aus Primärmaterial erlaubt, zur Verfügung, andererseits liegen Hinweise vor, bei welchen funktionellen Untersuchungen des Rezeptors mehrere UL33-Genotypen mit einbezogen werden sollten. Dies könnte die zukünftige Identifizierung eines natürlichen Liganden von UL33 unterstützen.

4.3.3 Genetische Kopplung von gB und UL33 und homologe Rekombination innerhalb von HCMV

Verschiedene HCMV-kodierte Gene weisen Polymorphismen auf. Dazu gehören eine Reihe von Glykoproteinen wie UL55, UL73, UL74, UL75 und UL115 als auch HCMV-kodierte Rezeptoren wie UL33 und UL144 sowie Proteine unbekannter Funktion wie UL11 und UL37 (Pignatelli *et al.*, 2004; Dolan *et al.*, 2004). Bisher konnten keine deutlichen Hinweise erbracht werden, dass genetische Kopplungen zwischen Genotypen variabler Gene vorliegen. Rasmussen *et al.* (2003) konnten jedoch zeigen, dass gB-2 (UL55) überdurchschnittlich häufig mit gH-1 (UL75) auftritt. Pignatelli *et al.* (2004) wiesen darauf hin, dass genetische Kopplungen im Allgemeinen seltene Ereignisse sind und allenfalls in HCMV bei funktionell ähnlichen und benachbarten Genen zu erwarten sind.

In der vorliegenden Arbeit ergaben sich keine Hinweise auf eine Kopplung von gB und UL33 (siehe Tab. 3.8). Die genetische Vielfalt von HCMV wird wahrscheinlich wesentlich über homologe Rekombination mitbestimmt, wie an gB gezeigt werden konnte (Haberland *et al.*, 1999). Die hierzu notwendige Mehrfachinfektion einer Zelle kommt vor allem bei

immunsupprimierten Patienten vor.

Es ist unklar, ob der bisherig alleinige Nachweis von gB-5 in Patienten mit AIDS auf Mehrfachinfektion und homologer Rekombination der gB-Genotypen 1-4 beruht. Sequenzvergleiche der gB-Genotypen 1-5 konnten zeigen, dass gB-5 möglicherweise das Produkt homologer Rekombination der Genotypen gB-1 und gB-3 darstellen könnte (nicht aufgeführte Daten; B. Ehlers, unpubliziert). Andererseits könnte eine spezifische Interaktion zwischen HCMV und HIV für das Auftreten von gB-5 in Patienten mit AIDS verantwortlich sein. Sowohl in klinischen Studien als auch *in vitro* konnten Synergismen beziehungsweise vielfältige Interaktionen zwischen HCMV und HIV nachgewiesen werden (Steininger *et al.*, 2006).

Für die UL33-Genotypen 1-4 ergaben sich auf Sequenzebene (siehe Abschnitt 3.3.3 und Abb. 3.13) keine Hinweise auf homologe Rekombination zwischen den einzelnen Genotypen.

4.4 Abschließende Bemerkungen und Ausblick

Vor allem die Gesundheit von Feten, Neugeborenen und immunsupprimierten Patienten wird durch HCMV beeinträchtigt. Als häufigste prä- und perinatale Virusinfektion des Menschen stellt HCMV ein Agens dar, das bei vielen Kindern zu einseitigen Hörverlusten führt, in weiteren Fällen noch schwerwiegendere Symptomatiken verursacht wie beispielsweise Mikroencephalie und mentale Retardierung. Immunsupprimierte erleiden schwere Organinfektionen durch HCMV wie beispielsweise Hepatitis, Retinitis et cetera.

Die aktive Immunisierung stellt eine der effektivsten und elegantesten Interventionsmöglichkeiten der modernen Medizin dar und kann als Präventionsmaßnahme eine Primärinfektion mit Krankheitserregern verhindern. Für HCMV stehen derzeit noch keine effektiven aktiven Impfungen zur Verfügung (Adler, 2008). Mit der in dieser Arbeit entwickelten Methodik können mehrere Genotypen in einer Probe und auch hochdivergente Genotypen nachgewiesen werden. Damit steht selbst für vieluntersuchte Gene wie gB erstmals eine geeignete Methodik zur Verfügung, um die Sequenzvarianten eines polymorphen Oberflächenproteines von HCMV umfassend darzustellen. Dies ist für die Identifikation von geeigneten Virusproteinen für Immunisierungen unbedingt notwendig.

Für Proben von 30 immunsupprimierten Patienten konnte mit der hier entwickelten Methodik die Varianz der HCMV-Infektion genauer charakterisiert werden. Für diese limitierte Gruppe zeigten sich in 30% (UL33) bis 40% (gB) Mehrfachinfektionen mit HCMV in einzelnen Proben. Therapeutische Konsequenzen wie eine antivirale Therapie bei dem Vorliegen mehrerer gB-

Diskussion

Genotypen in einem immunsupprimierten Patienten wurden bereits empfohlen, sind aber Gegenstand von Kontroversen und müssen zukünftig weiter untersucht werden (Coquette *et al.*, 2004; Crumpacker 2004).

GPCR stellen die wichtigsten Zielmoleküle heutiger Pharmaka dar. In dieser Arbeit erfolgte die erstmalige Untersuchung der Variabilität des in UL33 viruskodierten GPCR, wobei vor allem eine Variabilität der extrazellulären Rezeptoranteile gefunden wurde. Daher sollten bei zukünftigen funktionellen Untersuchungen auch Virusstämme wie Merlin auf Interaktionen mit möglichen extrazellulären Liganden untersucht werden. Bei Detektion eines Liganden besteht zugleich die Möglichkeit der pharmakologischen Beeinflussung des Rezeptors und damit des Ablaufs der HCMV-Infektion.

Die kommenden Jahre werden zeigen, ob und wie die wachsenden molekularbiologischen Erkenntnisse über HCMV die moderne Medizin bei der Versorgung von HCMV-erkrankten Menschen unterstützen können.

5. Zusammenfassung

Zytomegalie-Viren (HCMV) sind Krankheitserreger, die im Menschen lebenslang persistieren und eine Vielzahl von klinischen Manifestationen verursachen können, welche insbesondere bei immunsupprimierten Patienten auftreten. Vergleiche klinischer HCMV-Isolate zeigen multiple polymorphe Genbereiche, eine Serotypeneinteilung existiert bisher jedoch nicht.

Die Versuche verschiedener Autoren, Zusammenhänge zwischen dem klinischem Ablauf einer HCMV-Infektion und bestimmten Genotypen einzelner Genbereiche festzustellen, führten bisher lediglich zu einer widersprüchlichen Studienlage, ohne unmittelbare Praxisrelevanz.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine PCR-basierte Methodik zu entwickeln, die in klinischem Probenmaterial zusätzlich auch hochdivergente Genotypen und mehrere Genotypen in einer Probe nachweisen kann. Die Entwicklung und Evaluation der Methodik erfolgte an Glykoprotein B (gB). Nachfolgend wurde die Polymorphie von UL33, einem CMV-kodierten G-Protein-gekoppelten Rezeptor, untersucht.

Dafür wurden degenerierte nested-PCR-Systeme entwickelt, die hochsensitiv (≤ 10 Kopien / μl) einen Bereich um die Schnittstelle von gB beziehungsweise das gesamte UL33-Gen amplifizieren können. An Primaten-CMV (aus Schimpansen und Gorillas) konnte durch Amplifikation teilweise bisher unbekannter gB- und UL33-Sequenzen die Vielseitigkeit beider degenerierter nested-Primersysteme bestätigt werden.

Bei Untersuchungen mischinfizierter Proben mit degenerierten Primern wird, abhängig von Viruslast und Primeraffinität, vorwiegend ein Genotyp amplifiziert. Andere vorkommende Genotypen werden hingegen nicht detektiert. Um diese nicht detektierten Genotypen nachzuweisen, wurde der erstdetektierte Genotyp durch antisense-Oligonukleotide von der Amplifikation ausgeschlossen. Hierbei kamen als Nukleinsäure-Analoga locked-nucleic-acid Oligonukleotide (LNA) zum Einsatz. Es konnte gezeigt werden, dass – im Gegensatz zu Vermutungen anderer Autoren – LNA von mehr als 12 Basenpaaren Länge als spezifische antisense-Oligonukleotide dienen können. So erlaubten die für die vier gB-Genotypen synthetisierten LNA die spezifische Amplifikation eines unterrepräsentierten gB-Genotypen aus einer artifiziell vierfach mischinfizierten Probe.

Nachfolgend konnten die HCMV aus 30 Proben immunsupprimierter Patienten genotypisiert werden. Hierbei ergaben sich Hinweise darauf, dass der Anteil gB-mehrfachinfizierter Immunsupprimierter höher ist, als derzeit vermutet.

Folgende Bezeichnungen von UL33-Genotypen wurden vorgenommen: Stamm Merlin als

Zusammenfassung

UL33-1, Stamm Toledo als UL33-2 und Stamm AD169 als UL33-3. Genotyp UL33-4 konnte erstmals in dieser Arbeit nachgewiesen werden. Die Sequenzanalyse des putativen, gespleißten Proteinprodukts zeigte den neuen Genotypen als divergentesten mit größter Ähnlichkeit zu UL33-1 mit 94% Übereinstimmung auf Aminosäureebene. In der Gruppe der immunsupprimierten Patientenproben wurden die UL33-Genotypen 1-3 mit abnehmender Häufigkeit nachgewiesen. Insgesamt 30% der Proben zeigten HCMV-Infektionen mit mehreren UL33-Genotypen. Vergleiche der Sequenzvariabilität mit Strukturberechnungen des UL33-Rezeptors lassen eine Variabilität vor allem der extrazellulären Rezeptoranteile vermuten. Daher sollten zukünftige Studien zum Nachweis des natürlichen Liganden von UL33 unter anderem auch mit UL33-1 erfolgen.

Die UL33-nested-PCR und die zugehörigen LNA ermöglichten die Amplifikation des kompletten UL33-Gens mit allen seinen genotypischen Varianten. Die in dieser Arbeit entwickelte Methodik erlaubt den Nachweis bisher unbekannter hochdivergenter CMV-Genotypen und zeigt erstmals die Funktionalität von reinen LNA als inhibierende antisense-Oligonukleotide in degenerierten PCR.

6. Literaturverzeichnis

Adler SP. Human CMV vaccine trials: what if CMV caused a rash? *J Clin Virol* 2008;41(3):231-6.

Aquino VH, Figueiredo LT. High prevalence of renal transplant recipients infected with more than one cytomegalovirus glycoprotein B genotype. *J Med Virol* 2000;61(1):138-42.

Azzi M, Charest PG, Angers S, et al. Beta-arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(20):11406-11.

Beisser PS, Laurent L, Virelizier JL, Michelson S. Human cytomegalovirus chemokine receptor gene US28 is transcribed in latently infected THP-1 monocytes. *J Virol* 2001;75(13):5949-57.

Beisser PS, Vink C, Van Dam JG, Grauls G, Vanherle SJ, Bruggeman CA. The R33 G protein-coupled receptor gene of rat cytomegalovirus plays an essential role in the pathogenesis of viral infection. *J Virol* 1998;72(3):2352-63.

Binder T, Siegert W, Kruse A, et al. Identification of human cytomegalovirus variants by analysis of single strand conformation polymorphism and DNA sequencing of the envelope glycoprotein B gene region-distribution frequency in liver transplant recipients. *J Virol Methods* 1999;78(1-2):153-62.

Boehme KW, Guerrero M, Compton T. Human cytomegalovirus envelope glycoproteins B and H are necessary for TLR2 activation in permissive cells. *J Immunol* 2006;177(10):7094-102.

Bulenger S, Marullo S, Bouvier M. Emerging role of homo- and heterodimerization in G-protein-coupled receptor biosynthesis and maturation. *Trends Pharmacol Sci* 2005;26(3):131-7.

Cabrera-Vera TM, Vanhauwe J, Thomas TO, et al. Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr Rev* 2003;24(6):765-81.

Casarosa P, Bakker RA, Verzijl D, et al. Constitutive signaling of the human cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28. *J Biol Chem* 2001;276(2):1133-7.

Casarosa P, Gruijthuisen YK, Michel D, et al. Constitutive signaling of the human

Literaturverzeichnis

cytomegalovirus-encoded receptor UL33 differs from that of its rat cytomegalovirus homolog R33 by promiscuous activation of G proteins of the Gq, Gi, and Gs classes. *J Biol Chem* 2003a;278(50):50010-23.

Casarosa P, Menge WM, Minisini R, et al. Identification of the first nonpeptidergic inverse agonist for a constitutively active viral-encoded G protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 2003b;278(7):5172-8.

Cavalli-Sforza LL, Edwards AW. Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. *Am J Hum Genet* 1967;19(3 Pt 1):233-57.

Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, et al. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 1994;266(5192):1865-9.

Chantaraarphonkun S, Bhattarakosol P. Intra- and intergenotypic variations among human cytomegalovirus gB genotypes. *Intervirology* 2007;50(2):78-84.

Chern KC, Chandler DB, Martin DF, Kuppermann BD, Wolitz RA, Margolis TP. Glycoprotein B subtyping of cytomegalovirus (CMV) in the vitreous of patients with AIDS and CMV retinitis. *J Infect Dis* 1998;178(4):1149-53.

Chou SW, Dennison KM. Analysis of interstrain variation in cytomegalovirus glycoprotein B sequences encoding neutralization-related epitopes. *J Infect Dis* 1991;163(6):1229-34.

Coaquette A, Bourgeois A, Dirand C, Varin A, Chen W, Herbein G. Mixed cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis* 2004;39(2):155-61.

Compton T. Receptors and immune sensors: the complex entry path of human cytomegalovirus. *Trends Cell Biol* 2004;14(1):5-8.

Crumpacker CS. Mixed glycoprotein B genotypes of cytomegalovirus and immunosuppression. *Clin Infect Dis* 2004;39(2):162-4.

Davis-Poynter NJ, Lynch DM, Vally H, et al. Identification and characterization of a G protein-coupled receptor homolog encoded by murine cytomegalovirus. *J Virol* 1997;71(2):1521-9.

Deayton JR, Prof Sabin CA, Johnson MA, Emery VC, Wilson P, Griffiths PD. Importance of cytomegalovirus viraemia in risk of disease progression and death in HIV-infected patients

Literaturverzeichnis

receiving highly active antiretroviral therapy. *Lancet* 2004;363(9427):2116-21.

Demmler GJ. Congenital cytomegalovirus infection treatment. *Pediatr Infect Dis J* 2003;22(11):1005-6.

Diosi P. [Albert Jesionek tracking cytomegalovirus disease]. *Gesnerus* 1997;54(1-2):96-112.

Dolan A, Cunningham C, Hector RD, et al. Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *J Gen Virol* 2004;85:1301-12.

Dunn W, Chou C, Li H, et al. Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(24):14223-8.

Elkington R, Shoukry NH, Walker S, et al. Cross-reactive recognition of human and primate cytomegalovirus sequences by human CD4 cytotoxic T lymphocytes specific for glycoprotein B and H. *Eur J Immunol* 2004;34(11):3216-26.

Fraile-Ramos A, Kledal TN, Pelchen-Matthews A, Bowers K, Schwartz TW, Marsh M. The human cytomegalovirus US28 protein is located in endocytic vesicles and undergoes constitutive endocytosis and recycling. *Mol Biol Cell* 2001;12(6):1737-49.

Fraile-Ramos A, Pelchen-Matthews A, Kledal TN, Browne H, Schwartz TW, Marsh M. Localization of HCMV UL33 and US27 in endocytic compartments and viral membranes. *Traffic* 2002;3(3):218-32.

Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG, Schioth HB. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 2003;63(6):1256-72.

Fries BC, Chou S, Boeckh M, Torok-Storb B. Frequency distribution of cytomegalovirus envelope glycoprotein genotypes in bone marrow transplant recipients. *J Infect Dis* 1994;169(4):769-74.

Ghanouni P, Steenhuis JJ, Farrens DL, Kobilka BK. Agonist-induced conformational changes in the G-protein-coupling domain of the beta 2 adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(11):5997-6002.

Griffiths PD, Cope AV, Hassan-Walker AF, Emery VC. Diagnostic approaches to

Literaturverzeichnis

cytomegalovirus infection in bone marrow and organ transplantation. *Transpl Infect Dis* 1999;1(3):179-86.

Gruijthuisen YK, Beuken EV, Smit MJ, Leurs R, Bruggeman CA, Vink C. Mutational analysis of the R33-encoded G protein-coupled receptor of rat cytomegalovirus: identification of amino acid residues critical for cellular localization and ligand-independent signalling. *J Gen Virol* 2004;85:897-909.

Gruijthuisen YK, Casarosa P, Kaptein SJ, et al. The rat cytomegalovirus R33-encoded G protein-coupled receptor signals in a constitutive fashion. *J Virol* 2002;76(3):1328-38.

Haberland M, Meyer-Konig U, Hufert FT. Variation within the glycoprotein B gene of human cytomegalovirus is due to homologous recombination. *J Gen Virol* 1999;80:1495-500.

Hamprecht K, Maschmann J, Vochem M, Dietz K, Speer CP, Jahn G. Epidemiology of transmission of cytomegalovirus from mother to preterm infant by breastfeeding. *Lancet* 2001;357(9255):513-8.

Hebert TE, Moffett S, Morello JP, et al. A peptide derived from a beta2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. *J Biol Chem* 1996;271(27):16384-92.

Huang ES, Kilpatrick B, Lakeman A, Alford CA. Genetic analysis of a cytomegalovirus-like agent isolated from human brain. *J Virol* 1978;26(3):718-23.

Huelsenbeck JP. The robustness of two phylogenetic methods: four-taxon simulations reveal a slight superiority of maximum likelihood over neighbor joining. *Mol Biol Evol* 1995;12(5):843-9.

Isaacson MK, Feire AL, Compton T. Epidermal growth factor receptor is not required for human cytomegalovirus entry or signaling. *J Virol* 2007;81(12):6241-7.

Isegawa Y, Ping Z, Nakano K, Sugimoto N, Yamanishi K. Human herpesvirus 6 open reading frame U12 encodes a functional beta-chemokine receptor. *J Virol* 1998;72(7):6104-12.

Jensen G, Singh SK, Kumar R, Wengel J, Jacobsen JP. A comparison of the solution structures of an LNA:DNA duplex and the unmodified DNA:DNA duplex. *J Chem Soc, Perkin Trans 2* 2001:1224-32.

Literaturverzeichnis

Johnson DC, Hegde NR. Inhibition of the MHC class II antigen presentation pathway by human cytomegalovirus. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002;269:101-15.

Juretic D, Zoranic L, Zucic D. Basic charge clusters and predictions of membrane protein topology. *J Chem Inf Comput Sci* 2002;42(3):620-32.

Kinzler ER, Compton T. Characterization of human cytomegalovirus glycoprotein-induced cell-cell fusion. *J Virol* 2005;79(12):7827-37.

Kledal TN, Rosenkilde MM, Schwartz TW. Selective recognition of the membrane-bound CX3C chemokine, fractalkine, by the human cytomegalovirus-encoded broad-spectrum receptor US28. *FEBS Lett* 1998;441(2):209-14.

Kristiansen K. Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacol Ther* 2004;103(1):21-80.

Lefkowitz RJ. Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci* 2004;25(8):413-22.

Maggio R, Vogel Z, Wess J. Coexpression studies with mutant muscarinic/adrenergic receptors provide evidence for intermolecular "cross-talk" between G-protein-linked receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(7):3103-7.

Margulies BJ, Browne H, Gibson W. Identification of the human cytomegalovirus G protein-coupled receptor homologue encoded by UL33 in infected cells and enveloped virus particles. *Virology* 1996;225(1):111-25.

Margulies BJ, Gibson W. The chemokine receptor homologue encoded by US27 of human cytomegalovirus is heavily glycosylated and is present in infected human foreskin fibroblasts and enveloped virus particles. *Virus Res* 2007;123(1):57-71.

Melnychuk RM, Smith P, Kreklywich CN, et al. Mouse cytomegalovirus M33 is necessary and sufficient in virus-induced vascular smooth muscle cell migration. *J Virol* 2005;79(16):10788-95.

Meyer-Konig U, Haberland M, von Laer D, Haller O, Hufert FT. Intragenic variability of human cytomegalovirus glycoprotein B in clinical strains. *J Infect Dis* 1998a;177(5):1162-9.

Literaturverzeichnis

- Meyer-Konig U, Hufert FT, von Laer DM. Infection of blood and bone marrow cells with the human cytomegalovirus in vivo. *Leuk Lymphoma* 1997;25(5-6):445-54.
- Meyer-Konig U, Vogelberg C, Bongarts A, et al. Glycoprotein B genotype correlates with cell tropism in vivo of human cytomegalovirus infection. *J Med Virol* 1998b;55(1):75-81.
- Milne RS, Mattick C, Nicholson L, Devaraj P, Alcami A, Gompels UA. RANTES binding and down-regulation by a novel human herpesvirus-6 beta chemokine receptor. *J Immunol* 2000;164(5):2396-404.
- Mirzadegan T, Benko G, Filipek S, Palczewski K. Sequence analyses of G-protein-coupled receptors: similarities to rhodopsin. *Biochemistry* 2003;42(10):2759-67.
- Mocarski Jr. ES ST, Pass RF. Cytomegalovirus. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins 2007(5th ed):2702-71.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986;51:263-73.
- Murphy E, Rigoutsos I, Shibuya T, Shenk TE. Reevaluation of human cytomegalovirus coding potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(23):13585-90.
- Navarro D, Paz P, Tugizov S, Topp K, La Vail J, Pereira L. Glycoprotein B of human cytomegalovirus promotes virion penetration into cells, transmission of infection from cell to cell, and fusion of infected cells. *Virology* 1993;197(1):143-58.
- Nielsen KE, Rasmussen J, Kumar R, Wengel J, Jacobsen JP, Petersen M. NMR studies of fully modified locked nucleic acid (LNA) hybrids: solution structure of an LNA:RNA hybrid and characterization of an LNA:DNA hybrid. *Bioconjug Chem* 2004;15(3):449-57.
- Nomura H, Nielsen BW, Matsushima K. Molecular cloning of cDNAs encoding a LD78 receptor and putative leukocyte chemotactic peptide receptors. *Int Immunol* 1993;5(10):1239-49.
- Oliveira SA, Shenk TE. Murine cytomegalovirus M78 protein, a G protein-coupled receptor homologue, is a constituent of the virion and facilitates accumulation of immediate-early viral mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(6):3237-42.

Literaturverzeichnis

- Pacsa AS, Essa S, Voevodin A, et al. Correlation between CMV genotypes, multiple infections with herpesviruses (HHV-6, 7) and development of CMV disease in kidney recipients in Kuwait. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003;35(2):125-30.
- Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, et al. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 2000;289(5480):739-45.
- Pellet PE RB. The Family of the Herpesviridae: A Brief Introduction. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins 2007(5th ed):2480-99.
- Perot K, Walker CM, Spaete RR. Primary chimpanzee skin fibroblast cells are fully permissive for human cytomegalovirus replication. *J Gen Virol* 1992;73:3281-4.
- Petersen M, Nielsen JT, Bondensgaard K, Wengel J, Jacobsen JP. Structural characterization of LNA and alpha-L-LNA hybridized to RNA. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2003;22(5-8):1691-3.
- Pignatelli S, Dal Monte P, Rossini G, Landini MP. Genetic polymorphisms among human cytomegalovirus (HCMV) wild-type strains. *Rev Med Virol* 2004;14(6):383-410.
- Pleskoff O, Treboute C, BreLOT A, Heveker N, Seman M, Alizon M. Identification of a chemokine receptor encoded by human cytomegalovirus as a cofactor for HIV-1 entry. *Science* 1997;276(5320):1874-8.
- Prepens S, Kreuzer KA, Leendertz F, Nitsche A, Ehlers B. Discovery of herpesviruses in multi-infected primates using locked nucleic acids (LNA) and a bigenic PCR approach. *Virol J* 2007;4:84.
- Rasmussen L, Geissler A, Winters M. Inter- and intragenic variations complicate the molecular epidemiology of human cytomegalovirus. *J Infect Dis* 2003;187(5):809-19.
- Rasmussen L, Hong C, Zipeto D, et al. Cytomegalovirus gB genotype distribution differs in human immunodeficiency virus-infected patients and immunocompromised allograft recipients. *J Infect Dis* 1997;175(1):179-84.
- Rigoutsos I, Novotny J, Huynh T, et al. In silico pattern-based analysis of the human cytomegalovirus genome. *J Virol* 2003;77(7):4326-44.

Literaturverzeichnis

Rosenkilde MM, Kledal TN. Targeting herpesvirus reliance of the chemokine system. *Curr Drug Targets* 2006;7(1):103-18.

Roux KH. Optimization and troubleshooting in PCR. *PCR Methods Appl* 1995;4(5):S185-94.

Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;4(4):406-25.

Sanger F, Air GM, Barrell BG, et al. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 1977;265(5596):687-95.

Schleiss M. Progress in cytomegalovirus vaccine development. *Herpes* 2005;12(3):66-75.

Schoneberg T, Schulz A, Biebermann H, Hermsdorf T, Rompler H, Sangkuhl K. Mutant G-protein-coupled receptors as a cause of human diseases. *Pharmacol Ther* 2004;104(3):173-206.

Shepp DH, Match ME, Lipson SM, Pergolizzi RG. A fifth human cytomegalovirus glycoprotein B genotype. *Res Virol* 1998;149(2):109-14.

Singh SK, Kumar R, Wengel J. Synthesis of Novel Bicyclo[2.2.1] Ribonucleosides: 2'-Amino- and 2'-Thio-LNA Monomeric Nucleosides. *J Org Chem* 1998;63(18):6078-9.

Stassen FR, Vega-Cordova X, Vliegen I, Bruggeman CA. Immune activation following cytomegalovirus infection: more important than direct viral effects in cardiovascular disease? *J Clin Virol* 2006;35(3):349-53.

Steininger C, Puchhammer-Stockl E, Popow-Kraupp T. Cytomegalovirus disease in the era of highly active antiretroviral therapy (HAART). *J Clin Virol* 2006;37(1):1-9.

Streblow DN, Kreklywich CN, Smith P, et al. Rat cytomegalovirus-accelerated transplant vascular sclerosis is reduced with mutation of the chemokine-receptor R33. *Am J Transplant* 2005;5(3):436-42.

Streblow DN, Soderberg-Naucler C, Vieira J, et al. The human cytomegalovirus chemokine receptor US28 mediates vascular smooth muscle cell migration. *Cell* 1999;99(5):511-20.

Streblow DN, Vomaske J, Smith P, et al. Human cytomegalovirus chemokine receptor US28-induced smooth muscle cell migration is mediated by focal adhesion kinase and Src. *J Biol Chem* 2003;278(50):50456-65.

Literaturverzeichnis

- Strive T, Borst E, Messerle M, Radsak K. Proteolytic processing of human cytomegalovirus glycoprotein B is dispensable for viral growth in culture. *J Virol* 2002;76(3):1252-64.
- Swinkels BW, Geelen JL, Wertheim-van Dillen P, van Es AA, van der Noordaa J. Initial characterization of four cytomegalovirus strains isolated from chimpanzees. Brief report. *Arch Virol* 1984;82(1-2):125-8.
- Tarrago D, Quereda C, Tenorio A. Different cytomegalovirus glycoprotein B genotype distribution in serum and cerebrospinal fluid specimens determined by a novel multiplex nested PCR. *J Clin Microbiol* 2003;41(7):2872-7.
- Tateno Y, Takezaki N, Nei M. Relative efficiencies of the maximum-likelihood, neighbor-joining, and maximum-parsimony methods when substitution rate varies with site. *Mol Biol Evol* 1994;11(2):261-77.
- Trincado DE, Scott GM, White PA, Hunt C, Rasmussen L, Rawlinson WD. Human cytomegalovirus strains associated with congenital and perinatal infections. *J Med Virol* 2000;61(4):481-7.
- Tugizov S, Maidji E, Xiao J, Zheng Z, Pereira L. Human cytomegalovirus glycoprotein B contains autonomous determinants for vectorial targeting to apical membranes of polarized epithelial cells. *J Virol* 1998;72(9):7374-86.
- Tugizov S, Wang Y, Qadri I, Navarro D, Maidji E, Pereira L. Mutated forms of human cytomegalovirus glycoprotein B are impaired in inducing syncytium formation. *Virology* 1995;209(2):580-91.
- Vischer HF, Leurs R, Smit MJ. HCMV-encoded G-protein-coupled receptors as constitutively active modulators of cellular signaling networks. *Trends Pharmacol Sci* 2006;27(1):56-63.
- Vogelberg C, Meyer-Konig U, Hufert FT, Kirste G, von Laer D. Human cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in renal transplant recipients. *J Med Virol* 1996;50(1):31-4.
- Wang X, Huong SM, Chiu ML, Raab-Traub N, Huang ES. Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature* 2003;424(6947):456-61.
- Weinstein H, Zhang D, Ballesteros JA. Hallucinogens acting at 5-HT receptors: toward a mechanistic understanding at atomic resolution. *NIDA Res Monogr* 1994;146:241-62.

Literaturverzeichnis

You Y, Moreira BG, Behlke MA, Owczarzy R. Design of LNA probes that improve mismatch discrimination. *Nucleic Acids Res* 2006;34(8):e60.

Zheng SS, Zhou L, Qian J, Cai T, Fan J, Ma WH. Cytomegalovirus glycoprotein B sequence variation in Chinese liver transplant recipients. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2002;1(1):26-9.

Zipeto D, Hong C, Gerna G, et al. Geographic and demographic differences in the frequency of human cytomegalovirus gB genotypes 1-4 in immunocompromised patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998;14(6):533-6.

Anhang

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1.1: Schema eines Herpesvirions
- Abbildung 1.2: Zytomegalie: Einschluß-körperchen in Nierentubuluszellen bei HCMV-Infektion
- Abbildung 1.3: HCMV-Retinitis
- Abbildung 1.4: Darstellung der Variabilität der Gene der unique left Region von HCMV
- Abbildung 1.5: Schematische Darstellung von Glykoprotein B als ungeschnittenes Polyprotein
- Abbildung 1.6: Strukturmodell eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors
- Abbildung 2.1: DNA-Längenstandards 100 bp DNA ladder und Lambda BstEII
- Abbildung 2.2: Struktur und Konfiguration von LNA- und DNA-Monomeren
- Abbildung 2.3: Definition der Basenfehlpaarungs-Diskriminierungs-Schmelztemperatur-Differenz (ΔT_m)
- Abbildung 3.1 A-D: Primer zur Amplifikation der cleavage-site von gB
- Abbildung 3.2: Darstellung des Glykoprotein B Gens mit den Positionen der äußeren und inneren Primer der nested-PCR
- Abbildung 3.3: Darstellung der Gene UL32, UL33 und UL34 mit den Positionen der äußeren und inneren Primer der nested-PCR
- Abbildung 3.4: Sensitivität der äußeren Primer der nested-PCR für das gB-Gen
- Abbildung 3.5: Sensitivität der äußeren Primer der nested-PCR für das UL33-Gen
- Abbildung 3.6: Bindungsstellen der antisense LNA-Oligonukleotide in den gB- (A-D) und UL33 (E-F) Genen
- Abbildung 3.7: Gelelektrophoretische Auftrennung zur Darstellung der Inhibitions-wirkung und Spezifität der gB-LNA an einer gB-1-Matrize
- Abbildung 3.8: Gelelektrophoretische Auftrennung zur Darstellung der Inhibitions-wirkung und Spezifität der gB-LNA an einer gB-2-Matrize
- Abbildung 3.9: Gelelektrophoretische Auftrennung zur Darstellung der Inhibitions-wirkung und Spezifität der gB-LNA an einer gB-3-Matrize
- Abbildung 3.10: Gelelektrophoretische Auftrennung zur Darstellung der Inhibitions-wirkung und Spezifität der gB-LNA an einer gB-4-Matrize

Anhang

- Abbildung 3.11: Phylogenetischer Stammbaum der gB-Genotypen basierend auf den putativen Aminosäuresequenzen des gesamten gB-Gens
- Abbildung 3.12: Phylogenetischer Stammbaum der UL33-Genotypen basierend auf den putativen Aminosäuresequenzen des gesamten UL33-Gens
- Abbildung 3.13: Alignment der UL33-Genotypen 1-4 mit Darstellung der vermuteten Proteinabschnitte des GPCR
- Abbildung 3.14: Graphische Darstellung der absoluten Häufigkeiten der gB- und UL33-Genotypen aus Proben immunsupprimierter Patienten

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1:	Übersicht über die Familie der Herpesviridae des Menschen
Tabelle 1.2 A-C:	Auswahl von Arbeiten zur cleavage-site des Glykoprotein B
Tabelle 1.3:	Eigenschaften von HCMV-kodierten G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
Tabelle 2.1 A, B:	Verwendete Primersets
Tabelle 2.2:	Verwendete Locked-nucleic-acid Oligonukleotide
Tabelle 2.3 A-C:	Humane Untersuchungsproben
Tabelle 2.4:	Tierische Untersuchungsproben
Tabelle 2.5:	Reaktionsbedingungen des „Standard-PCR-Protokolls“
Tabelle 2.6:	Reaktionsbedingungen des „ramp-time-PCR-Protokolls“
Tabelle 2.7:	Schmelztemperaturunterschiede von DNA-DNA- und LNA-DNA-Basenpaaren. T_m = Schmelztemperatur (Nach You et al., 2006)
Tabelle 2.8:	Reaktionsbedingungen für Sequenzierungs-PCR
Tabelle 3.1:	Optimierte Reaktionsbedingungen der ersten und zweiten Runde des „ramp-time-PCR-Protokolls“ für gB
Tabelle 3.2:	Optimierte Reaktionsbedingungen der ersten Runde des „Standard-PCR-Protokolls“ für UL33
Tabelle 3.3:	Inhibitionsfaktoren der gB-LNA
Tabelle 3.4:	Aminosäure-Übereinstimmungen der gB-Genotypen in Prozent
Tabelle 3.5:	Aminosäure-Übereinstimmungen der UL33-Genotypen in Prozent
Tabelle 3.6:	Auflistung von 38 Humanproben mit in den Proben bestimmten gB- und UL33-Genotypen
Tabelle 3.7:	Absolute Häufigkeiten von gB- und UL33-Genotypen in 38 genotypisierten Humanproben
Tabelle 3.8:	Kookkurrenzen von gB- und UL33-Genotypen
Tabelle 3.9:	Übersicht über erfolgte Amplifikat- und Sequenzerzeugungen aus nicht-humanen Primaten-CMV

Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Jonas Merlin Sintram Deckers, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Untersuchung der Variabilität eines Glykoproteins und eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors (UL55, UL33) von Zytomegalie-Viren“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Eigene Publikationen

Manuskript in Vorbereitung: **Human herpesviruses and their genotypic variants can both be differentiated by universal, locked-nucleic-acid-based PCR: Discovery of a novel genotype of human cytomegalovirus UL33**

Merlin Deckers, Sandra Prepens, Jörg Hofmann, Karl-Anton Kreuzer, Abigail Edubio, Sebastian Voigt and Bernhard Ehlers.

Eingereicht beim Journal of General Virology: **Novel cytomegaloviruses in free-ranging and captive great apes: phylogenetic evidence for bidirectional horizontal transmission**

Fabian H. Leendertz, Merlin Deckers, Werner Schempp, Felix Lankester, Christophe Boesch, Gottfried Hohmann, Lawrence Mugisha, Aidan Dolan, Derek Gatherer, Duncan J. McGeoch and Bernhard Ehlers.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Krüger bedanken, ohne ihn wäre mein Promotionsvorhaben nicht durchführbar gewesen. Ich habe seine freundliche und umsichtige Unterstützung sehr zu schätzen gewusst.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Dr. Bernhard Ehlers, dem Leiter der Arbeitsgruppe „Molekulare Genetik und Epidemiologie von Herpesviren“ im Robert Koch-Institut. Ihm verdanke ich die grundlegende Konzeption und Begleitung dieser Arbeit. Als „Forschungsanfänger“ hat er mich geduldig bei molekularbiologischen und virologischen Fragestellungen beraten – eine bessere Betreuung kann man sich nicht wünschen.

Für Hilfestellungen bei der praktischen Durchführung der Arbeit möchte ich mich vor allem bei Nezhisah Yasmun und Sonja Liebermann bedanken, die mich in die Grundlagen molekularbiologischer Arbeitstechnik einführten. Mein Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe P14 für den überaus kollegialen Umgang. Bezüglich theoretischer und praktischer Fragestellungen erhielt ich kompetente Beratung von Sandra Prepens. Sie war eine unschätzbare Hilfe bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Bei Herrn PD Dr. J. Hofmann vom Institut für Virologie der Charité möchte ich mich ganz herzlich bedanken für die gute Kooperation. Für moralische Unterstützung und kompetentes Korrekturlesen danke ich meinen FreundInnen Moritz Hilbrandt und Lena Däuker.

Wie bei meiner gesamten Ausbildung bin ich meinen Eltern überaus dankbar für ihre liebevolle Unterstützung. Meiner Mutter möchte ich zudem noch ganz herzlich für das Korrekturlesen danken. Schließlich gilt mein herzlicher Dank meiner Freundin Lisa Cabrera. Sie unterstützte mich so geduldig und doch ausreichend ungeduldig in meinem Prozess der Fertigstellung dieser Arbeit.