

Analysen zum Wirkmechanismus antiviraler
Substanzen gerichtet gegen das
Humane Cytomegalovirus

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Thomas Georg Goldner
aus Wuppertal
Düsseldorf, Mai 2012

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Ralf Wagner
Korreferenten: Prof. Dr. Gerhard Steger
Prof. Dr. Heiner Schaal

Tag der mündlichen Prüfung:

Danksagung

Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden bei der Firma AiCuris GmbH & Co. KG in Wuppertal in Kooperation mit dem Institut für Physikalische Biologie und dem Institut für Virologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

Danken möchte ich an dieser Stelle

Herrn Dr. Peter Lischka, AiCuris GmbH & Co. KG, für seine stetige und freundliche wissenschaftliche Betreuung, Unterstützung und Hilfsbereitschaft während der gesamten Vorbereitung der Promotion sowie für die harmonische Zusammenarbeit;

Herrn Prof. Dr. Heiner Schaal, Institut für Virologie, und Herrn Prof. Dr. Gerhard Steger, Institut für Physikalische Biologie, für ihre stetige und freundliche wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung;

Herrn Prof. Dr. Rolf Wagner, Institut für Physikalische Biologie, für sein Interesse an meiner Dissertation und die bereitwillige Übernahme des Referats;

Frau Prof. Dr. Helga Rübsamen-Schaeff für die Vergabe des Promotionsthemas sowie für die Möglichkeit, meine Experimente in den Laboren der AiCuris GmbH & Co. KG durchzuführen;

Herrn PD Dr. Joachim Granzin, Institut für Komplexe Systeme, Forschungszentrum Jülich, für seine freundliche Hilfe bei den Strukturanalysen;

Frau Marion Heidtmann, Frau Christine Hempel und Frau Kerstin Pixberg, AiCuris GmbH & Co. KG, für die kollegiale Zusammenarbeit;

Herrn Dr. Stefan Falker, AiCuris GmbH & Co. KG, für seine Unterstützung bei der Vollendung dieser Arbeit;

allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Firma AiCuris GmbH & Co. KG für ihre Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre;

meiner Familie und meinen Freunden für ihre stetige Unterstützung und

meiner Frau Jessika Westen für Ihre Geduld und Hilfsbereitschaft.

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
AC	„ <i>assembly compartment</i> “ Assemblierungs-Kompartiment
ACD	„ <i>amino terminal conserved domain</i> “ Aminoterminal konservierte Domäne
ACV	Acyclovir
AIDS	„ <i>acquired immunodeficiency syndrome</i> “ Erworbenes Immundefizienz-Syndrom
AMP	Ampicillin
AS	Aminosäure
AS-Sub.	Aminosäuresubstitution
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	„ <i>bacterial artificial chromosome</i> “ Bakterielles artifizielles Chromosom
bp	Basenpaar
BSA	„ <i>bovine serum albumin</i> “ Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
CAM	Chloramphenicol
CCD	„ <i>charge-coupled-device</i> “ Ladungsgekoppelte Einheit
CD	Carboxyterminale Domäne
CDV	Cidofovir
cm ²	Quadratzentimeter
CPV	Cyclopropavir
D+	Seropositiv
Dapi	4,6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	„ <i>desoxyribonucleinacid</i> “ Desoxyribonukleinsäure
E	„ <i>early</i> “ Früh
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	„ <i>enhanced green fluorescent protein</i> “ Verstärkt grün fluoreszierendes Protein
EGFR	„ <i>epidermal growth factor receptor</i> “ Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
EM	Elektronenmikroskopie
EBV	Epstein-Barr-Virus
EC ₅₀	Substanzkonzentration die einen halbmaximalen inhibitorischen Effekt induziert
EC ₉₀	Substanzkonzentration die einen 90%igen inhibitorischen Effekt induziert
ER	Endoplasmatisches Retikulum

FW	„forward“ Vorwärts
FOS	Foscarnet
GCV	Ganciclovir
GPCMV	„guinea pig cytomegalovirus“ Meerschweinchen-Cytomegalovirus
HAART	„highly active anti-retroviral therapy“ Hochaktive Antiretrovirale Therapie
HCMV	Humanes Cytomegalovirus
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HHV-1	Humanes Herpesvirus 1
HHV-2	Humanes Herpesvirus 2
HHV-3	Humanes Herpesvirus 3
HHV-4	Humanes Herpesvirus 4
HHV-5	Humanes Herpesvirus 5
HHV-6	Humanes Herpesvirus 6
HHV-7	Humanes Herpesvirus 7
HHV-8	Humanes Herpesvirus 8
HRP	„horseradish-peroxidase“ Meerrettichperoxidase
HSV-1	Herpes-Simplex-Virus Typ 1
HSV-2	Herpes-Simplex Virus Typ 2
IE	„immediate-early“ Sehr früh
IL8	Interleukin 8
INM	„inner nuclear membrane“ Innere Kernmembran
IR	„internal repeat“ Internes repetitives Element
IRS	„internal repeat short“ Internes repetitives kurzes Element
KAN	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Kryo-EM	Kryo-Elektronenmikroskopie
KSHV	Kaposi-Sarkom-assoziiertes Herpesvirus
L	„late“ Spät
LB	Luria Bertani
LK	Ladekontrolle
Lyt	„lytic replication“ Lytische Replikation
M	Maus
M	Mock (Zellkontrolle)
MCP	„major capsid protein“
mg	Milligramm
MIEP	„major immediate-early promoter“
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar

MnCP	„ <i>minor capsid protein</i> “
MnCP-bp	„ <i>minor capsid binding protein</i> “
MOI	„ <i>multiplicity of infection</i> “ Multiplizität der Infektion
n x g	n-fache Erdbeschleunigung
NEC	„ <i>multi-component nuclear egress complex</i> “
NEB	New England Biolabs
ng	Nanogramm
NHDF	<i>normal human dermal fibroblast</i> Normale humane Hautfibroblasten
NIEP	„ <i>non-infectious enveloped particle</i> “ Nicht infektiöse Partikel
NK	Negativkontrolle
NLS	„ <i>nuclear localization signal</i> “ Kernlokalisationssequenz
NMR	„ <i>Nuclear Magnetic Resonancespectroscopy</i> “ Kernspinresonanzspektroskopie
nm	Nanometer
ONM	„ <i>outer nuclear membrane</i> “ Äußere Kernmembran
OD	Optische Dichte
ORF	„ <i>open reading frame</i> “ Offener Leserahmen
<i>ori</i> Lyt	„ <i>origin of lytic replication</i> “ Startsequenz der Replikation
<i>Pac</i>	„ <i>cis acting packaging elements</i> “
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	„ <i>polymerase chain reaction</i> “ Polymerase Kettenreaktion
pAP	„ <i>assembly protein precursor</i> “
PDGFR	„ <i>platelet derived growth factor alpha receptor</i> “
pH	-log[H ⁺]
POD	Peroxidase
pPR	„ <i>protease precursor</i> “
qPCR	„ <i>Real-Time-PCR</i> “
R-	seronegativ
R	„ <i>rabbit</i> “ Kaninchen
RL	„ <i>repeat long</i> “
Rek.	Rekombination
Rev.	Revertante
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RI	Resistenz Index
RDV	Rice Dwarf Virus (Reis-Zwerg-Virus)
RNA	„ <i>ribonucleinacid</i> “ Ribonukleinsäure
rpm	„ <i>rounds per minute</i> “ Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur

RW	„reverse” Rückwärts
sek	Sekunde
SCP	„small capsid protein”
SI	Selektivitätsindex: halbmaximale zytotoxische Substanzkonzentration/ halbmaximale inhibitorische Substanzkonzentration (CC ₅₀ /EC ₅₀)
SOT	Solide Organtransplantation
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TRS	„terminal repeat short”
UL	„unique long”
US	„unique short”
ü.N.	Über Nacht
VACV	Valacyclovir
VGCV	Valganciclovir
VNTI	Vector NTI
VZV	Varizella-Zoster-Virus
Z	Ziege
ZPE	Zytopathischer Effekt
µF	Mikrofarad
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

DANKSAGUNG I

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....II

A. EINLEITUNG 1

A.1 Die Biologie des humanen Cytomegalovirus 1

A.1.1 Taxonomie 1

A.1.2 Epidemiologie 2

A.1.3 Der Aufbau des HCMV-Virions 3

A.1.4 Die HCMV-Genomorganisation 3

A.1.5 Der HCMV-Replikationszyklus 4

A.1.5.1 Der Virus-Eintritt 4

A.1.5.2 Die virale Genexpression 6

A.1.5.3 Die Struktur und Assemblierung des Nukleokapsids 7

A.1.5.4 Die Replikation und Verpackung des HCMV-Genoms 10

A.1.5.5 Das Ausschleusen des Nukleokapsids aus dem Zellkern 12

A.1.5.6 Der Zusammenbau des reifen Virions und das Ausschleusen aus der Zelle 13

A.2 Die Pathogenese des humanen Cytomegalovirus 13

A.2.1 HCMV-Pathogenese bei immunkompetenten Individuen 13

A.2.2 HCMV-Pathogenese bei Patienten mit inkompetentem Immunsystem 14

A.2.2.1 Transplantationspatienten 14

A.2.2.1.1 Solide Organtransplantationen (SOT) 15

A.2.2.1.2 Allogene Knochenmarktransplantationen 15

A.2.2.2 Patienten mit erworbenem Immundefizienz-Syndrom (AIDS) 16

A.2.2.3 Kongenital infizierte Neugeborene 16

A.3 Die antivirale Therapie einer HCMV-Infektion/Erkrankung 17

A.3.1 Prophylaktische und präemptive Therapie und Behandlung 17

A.3.2 Zugelassene Anti-HCMV-Substanzen 18

A.3.2.1 Ganciclovir und Valganciclovir 19

A.3.2.2 Foscarnet 19

A.3.2.3 Cidofovir 20

A.3.2.4 Acyclovir und Valacyclovir 20

A.3.3 Resistenzentwicklung gegen zugelassene Anti-HCMV-Substanzen 20

A.3.4 Anti-HCMV-Substanzen, deren klinische Entwicklung eingestellt wurde 21

A.3.4.1 HCMV-Terminaseinhibitoren 21

A.3.4.2 Maribavir 22

A.3.5 Anti-HCMV-Substanzen in der klinischen Entwicklung 23

A.3.5.1 Artesunat 24

A.3.5.2 CMX001 25

A.3.5.3 Cyclopropavir 25

A.3.5.4 AiCuris Anti-HCMV-Substanzen AIC246, AIC2 und AIC3 26

A.4 Zentrale Techniken zur wirkmechanistischen Analyse antiviraler HCMV-Substanzen 28

A.4.1 Die Mutagenese von Herpesviren 28

A.4.1 Die strukturelle Analyse von Proteinen mit Hilfe des komparativen Modelling 29

A.5 Zielsetzung der Arbeit 31

B. MATERIAL UND METHODEN 32

B.1 Material 32

B.1.1 Biologisches Material 32

B.1.2 Nukleinsäuren 33

B.1.2.1 Primer 33

B.1.2.2 Bacmide und Plasmide 36

B.1.3 Antivirale Substanzen 36

B.1.4 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Puffer und Lösungen 37

B.1.5 Antikörper 39

B.1.6	Restriktionsenzyme	40
B.1.7	Computer-Programme	40
B.1.8	Geräte	41
B.2	Methoden	42
B.2.1	Zellkultur	42
B.2.1.1	Kultivierung von Säugerzellen	42
B.2.1.2	Transfektion von HeLa-Zellen	42
B.2.1.3	Kryokonservierung	42
B.2.2	Virologische Methoden	43
B.2.2.1	Experimentelle Infektionen	43
B.2.2.2	Virusrekonstitution aus Bacmid-DNA	43
B.2.2.3	Herstellung von Virusstocks	43
B.2.2.4	Virustitration	44
B.2.2.5	Wachstumskurven	44
B.2.2.6	Ermittlung der antiviralen Aktivität	44
B.2.2.7	<i>Time-of-addition</i> -Kinetik	45
B.2.3	Molekularbiologische Methoden	46
B.2.3.1	Kultivierung und Selektion von Bakterien	46
B.2.3.2	Erzeugung elektrokompetenter <i>E. coli</i> GS1783	46
B.2.3.3	Erzeugung rekombinations- und elektrokompetenter <i>E. coli</i> GS1783	46
B.2.3.4	<i>En-passant</i> -Mutagenese (Bac-Mutagenese)	47
B.2.3.4.1	Design der Mutageneseprimer und Amplifizierung der Rekombinationskassette	48
B.2.3.4.2	Elektroporation der Rekombinationskassette in <i>E. coli</i> GS1783 und erste Red-Rekombination	50
B.2.3.4.3	Zweite Red-Rekombination - Elimination der Rekombinationskassette	51
B.2.3.5	Polymerasekettenreaktion (PCR)	51
B.2.3.5.1	Kolonie-PCR	52
B.2.3.6	Aufreinigung von viraler DNA	52
B.2.3.7	Analyse der viralen DNA-Replikation	53
B.2.4	Proteinbiochemische Methoden	54
B.2.4.1	Immunfluoreszenzanalyse	54
B.2.4.2	Immunoblotanalyse	55
C.	ERGEBNISSE	57
C.1	Analysen zur Bestimmung des Zeitpunkts des inhibitorischen Effekts der AIC-Substanzen innerhalb des HCMV-Replikationszyklus	57
C.2	Einfluss der AIC-Substanzen auf die virale DNA-Synthese	59
C.3	Einfluss der AIC-Substanzen auf die virale Genexpression	61
C.3.1	Einfluss auf die Akkumulation viraler Markerproteine	61
C.3.2	Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation von viralen Markerproteinen	63
C.3.3	Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation transient exprimierter Strukturproteine	67
C.4	Einfluss der AIC-Substanzen auf die Virusmorphogenese	70
C.5	Phäno- und Genotypisierung AIC246-, AIC2- und AIC3-resistenter Viren	72
C.5.1	Phänotypisierung AIC246-, AIC2- und AIC3-resistenter Viren	72
C.5.2	Genotypisierung AIC246-, AIC2- und AIC3-resistenter Viren	74
C.5.2.1	AIC246-resistente Viren	74
C.5.2.2	AIC2- bzw. AIC3-resistente Viren	75
C.6	Markertransfer-Analysen	77
C.6.1	Die Methodik der <i>En-passant</i> -Mutagenese am Beispiel der Generierung der rekombinanten Virusmutante RV-HG-UL56-R369S	77
C.6.2	Zusammenfassung aller durch <i>En-passant</i> -Mutagenese generierter Virusmutanten	82
C.6.3	Einfluss der inserierten Punktmutationen auf die Virusreplikation	85
C.6.4	Suszeptibilitäts-Analysen der generierten Virusmutanten	87
C.6.4.1	Rekombinante UL56-Virusmutanten	87
C.6.4.2	Rekombinante UL86-Virusmutanten	89
C.7	Die Resistenzmutation UL86-R583L - Schlüssel zur weiteren Charakterisierung des AIC2/AIC3-Wirkmechanismus?	93
C.7.1	Isolierung einer replikationskompetenten <i>rescue</i> -Virusmutante	93

C.7.2 Vergleichende Phänotypisierung der UL86-R583L-Virusmutanten	93
C.7.2.1 Fokus-Expansions-Analysen	93
C.7.2.2 Replikationsanalysen	95
C.7.3 Kartierung einer putativen <i>rescue</i> -Mutation durch vergleichende Sequenzanalysen	96
C.8 Analysen zur Lokalisation AIC2- bzw. AIC3-Resistenz vermittelnder Aminosäure-	
 substitutionen innerhalb der 3D-Struktur des HCMV-Hauptkapsidproteins MCP	98
C.8.1 Vergleich der HCMV- und HSV-1-Nukleokapsidstruktur	99
C.8.2 Primär- und Sekundärstrukturvergleich von HSV-1 VP5 und HCMV MCP	100
C.8.3 Komparatives Modelling der oberen Domäne des HCMV Hauptkapsidproteins	104
C.8.3.1 Vergleichende Analyse der Interaktionsdomäne der oberen HSV-1 VP5- und	
HCMV MCP-Domäne innerhalb der Hexon- und -Pentonkonformation	106
C.8.3.2 Untersuchungen zur Lokalisation der resistenzvermittelnden Aminosäure-	
substitutionen innerhalb der Hexon- und Penton-Konformation	109
8.3.3 Analysen zur Lokalisation AIC2- bzw. AIC3-Resistenz vermittelnder Aminosäure-	
substitutionen innerhalb der mittleren Domäne von HCMV MCP	111
D. DISKUSSION	113
ZUSAMMENFASSUNG	126
SUMMARY	127
REFERENZEN	128
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	153
TABELLENVERZEICHNIS	155
PUBLIKATIONEN	157
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	159

A. Einleitung

A.1 Die Biologie des humanen Cytomegalovirus

A.1.1 Taxonomie

Das humane Herpesvirus 5 (HHV-5), auch humanes Cytomegalovirus (HCMV) genannt, gehört zu der Familie der *Herpesviridae*. Diese weisen neben ihren biologischen und morphologischen Gemeinsamkeiten die Fähigkeit auf, ihren Wirt sowohl lytisch als auch latent zu infizieren. Von den über 120 bekannten Herpesvirustypen sind acht humanpathogen (vgl. Tab. 1) (77, 78).

Tab. 1: Taxonomie der humanpathogenen Herpesviren

Ordnung <i>Herpesvirales</i>, Familie <i>Herpesviridae</i>		
Unterfamilie α-<i>Herpesvirinae</i>		Allgemeine Bezeichnung
Humanes Herpesvirus 1	(HHV-1)	Herpes-Simplex-Virus Typ 1 (HSV-1)
Humanes Herpesvirus 2	(HHV-2)	Herpes-Simplex-Virus Typ 2 (HSV-2)
Humanes Herpesvirus 3	(HHV-3)	Varizella-Zoster-Virus (VZV)
Unterfamilie β-<i>Herpesvirinae</i>		
Humanes Herpesvirus 5	(HHV-5)	Humanes Cytomegalovirus (HCMV)
Humanes Herpesvirus 6	(HHV-6)	Roseolovirus
Humanes Herpesvirus 7	(HHV-7)	Roseolovirus
Unterfamilie γ-<i>Herpesvirinae</i>		
Humanes Herpesvirus 4	(HHV-4)	Epstein-Barr-Virus (EBV)
Humanes Herpesvirus 8	(HHV-8)	Kaposi-Sarkom-assoziiertes Herpesvirus (KSHV)

Verändert nach (77, 249)

Aufgrund von Unterschieden im Aufbau und der Sequenz des viralen Genoms sowie ihren biologischen Eigenschaften wie Wirtsspezifität, Zelltropismus oder Dauer des Replikationszyklus werden die *Herpesviridae* in drei Unterfamilien, die *Alpha-* (α), *Beta-* (β) und *Gamma-Herpesvirinae* (γ), unterteilt (249). *α -Herpesvirinae* - wie die Herpes-Simplex-Viren oder das Varizella-Zoster-Virus - zeichnen sich durch ein breites Wirtsspektrum sowie eine kurze Replikationszeit *in vitro* aus. Zu den lymphotropen *γ -Herpesvirinae* zählen das Epstein-Barr-Virus und das Kaposi-Sarkom-assoziierte Herpesvirus. Sie zeichnen sich durch ein enges Wirtsspektrum aus. Die Dauer des Replikationszyklus der *γ -Herpesvirinae* ist Virustyp abhängig.

β-Herpesvirinae unterscheiden sich von *α-* und *γ-Herpesvirinae* durch ein stark eingeschränktes Wirtsspektrum sowie einen langen Replikationszyklus *in vitro*. Zu den *β-Herpesvirinae* gehören die humanen Herpesviren Typ 6 und 7 (HHV-6, HHV-7) und HCMV als prototypischer Vertreter dieser Familie (249). HCMV wurde in den 1960er Jahren als Erreger der Einschusskörperchenkrankheit der Speicheldrüse identifiziert (118, 189, 247, 281). Charakteristisch für HCMV sind zytoplasmatische Einschlüsse, die zu einer massiven Vergrößerung der infizierten Zellen, der sogenannten Cytomegalie, führen (118, 189, 247, 281).

A.1.2 Epidemiologie

Das humane Cytomegalovirus ist ein opportunistisches, ubiquitär vorkommendes Pathogen (116, 327, 328). Seine Durchseuchungsrate innerhalb der Bevölkerung variiert in Abhängigkeit vom sozioökonomischen Status des Landes sowie seiner geografischen Lage. So liegt die HCMV-Seroprävalenz in Europa und in den USA bei etwa 60% der Bevölkerung und kann bis zu 100% in Entwicklungsländern betragen (105). Horizontal wird HCMV über Körpersekrete wie Urin, Stuhl, Blut, Samenflüssigkeit, Zervixsekret und Muttermilch übertragen (128, 132, 175, 177, 246). Der vertikale Transfer erfolgt im Falle einer Infektion während der Schwangerschaft perinatal von der Mutter auf das Kind (230, 290). Die kontinuierliche Verbreitung des Virus erfolgt insbesondere über Kleinkinder, da diese nach einer Infektion im frühen Kindesalter das Virus jahrelang über Speichel und Urin ausscheiden können (211). Mit Erreichen der Pubertät tritt der Virustransfer über Samenflüssigkeit und Zervixsekret in den Vordergrund (53, 104).

Wie bei allen Herpesviren führt eine HCMV-Primärinfektion zu einer lebenslangen Persistenz des Erregers im Wirtsorganismus, die von sporadischen Reaktivierungen unterbrochen werden kann. Während der Persistenz geht das Virus in die Latenz über, in der das virale Genom als Episom im Zellkern vorliegt und die Virusproduktion eingestellt ist (31). Als Orte der Latenz wurden bei HCMV unter anderem myeloide Progenitorzellen, periphere Monozyten und Endothelzellen nachgewiesen (147, 164, 253, 277, 305). Die Mechanismen, welche die Reaktivierung induzieren, sind größtenteils ungeklärt. Bekannt ist, dass die Induktion der während der Latenz reprimierten viralen *immediate-early-* (IE) Genexpression die Reaktivierung einleitet. In diesem Zusammenhang spielt die Differenzierung myeloider Progenitorzellen eine maßgebliche Rolle (122, 277, 298).

A.1.3 Der Aufbau des HCMV-Virions

Das HCMV hat eine Größe von ca. 150 - 200 Nanometern (nm) und eine für Herpesviren charakteristische Virusstruktur. Sein doppelsträngiges, lineares DNA-Genom wird von einem ca. 100 nm großen ikosaedrisch angeordneten Nukleokapsid umschlossen. Das Nukleokapsid wiederum wird von einer amorphen, relativ unstrukturierten Proteinmatrix, dem sogenannten Tegument, umhüllt (vgl. Abb. 1). Dem Tegument werden neben über 30 viralen auch zelluläre Proteine zugeordnet (112, 315). Die größtenteils phosphorylierten viralen Tegumentproteine sind unter anderem an der Virusmorphogenese, dem Nukleokapsid-Transport, der Immunmodulation und der Regulation der Genexpression beteiligt (vgl. Abb. 1) (149).

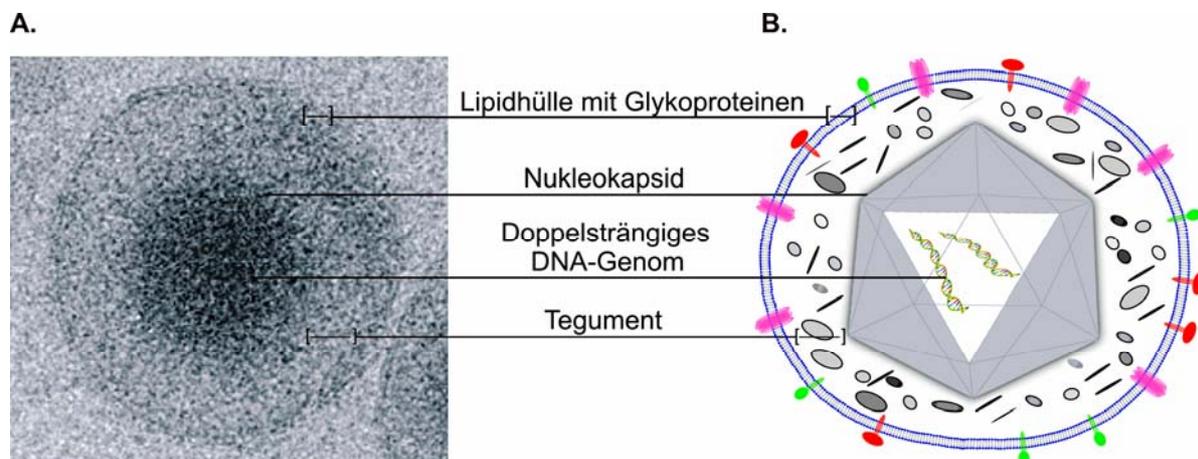


Abb. 1: Struktur des HCMV-Virions

(A) Elektronenmikroskopische (EM) Aufnahme eines HCMV-Partikels. Verändert nach (16)

(B) Schematische Darstellung eines HCMV-Partikels

Das Tegument wird von einer von frühen Endosomen und vom Golgi-Apparat abgeleiteten Virushülle umgeben (49). In dieser Hüllmembran eingelagert befinden sich virale Glykoproteinkomplexe, die für die Virusadsorption und Penetration benötigt werden (vgl. Abb. 1) (112, 120).

A.1.4 Die HCMV-Genomorganisation

Das HCMV-DNA-Genom kodiert für ca. 160 - 180 Proteine und ist mit ca. 235 Kilobasen (kb) das größte und komplexeste aller Herpesviren (54, 55, 79, 212). Es wird in die nicht repetitiven Genomsegmente *unique long* (U_L) und *unique short* (U_S) unterteilt, die von repetitiven Genomsegmenten, den sogenannten *terminal-* (R_L ,

repeat long; TR_S, *terminal repeat short*) und *internal repeats* (IR_S), flankiert werden (vgl. Abb. 2).

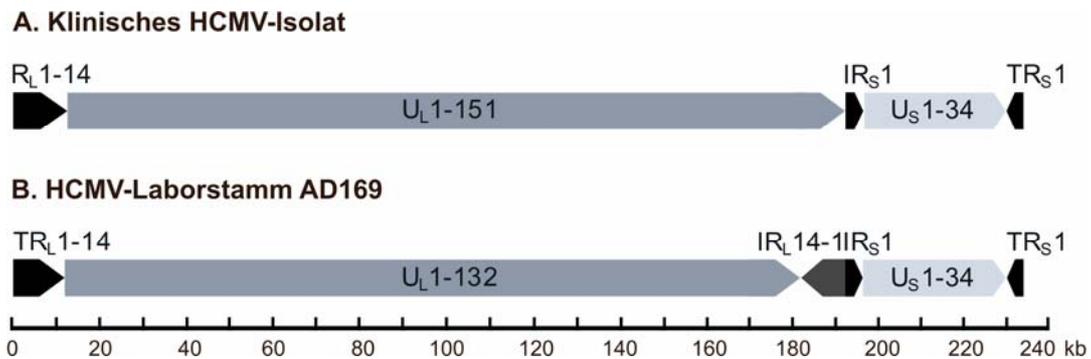


Abb. 2: Die HCMV-Genomorganisation

Die Orientierung der Gensegmente entspricht der Pfeilorientierung. Entsprechend der Nomenklatur werden die kodierenden Gene mit den Präfixen U_L, U_S, TR bzw. IR versehen.

(A) Schematische Darstellung der Genomorganisation klinischer HCMV-Isolate. Die nicht repetitiven Segmente U_L (*unique long*) und U_S (*unique short*) werden von den repetitiven Elementen R_L (*repeat long*), IR_S (*internal repeat short*) und TR_S (*terminal repeat short*) flankiert.

(B) Schematische Darstellung der Genomorganisation des Laborstamms AD169. Die U_L-Region ist um die Leserahmen UL128-UL150 partiell deletiert und wird zusätzlich von einer inversen Duplikation der R_L-Region (IR_L 1-14) flankiert. Bei HCMV-Laborstämmen führen die während der DNA-Replikation auftretenden intramolekularen Rekombinationen der repetitiven Regionen zu vier in äquimolarer Menge vorkommenden isomeren Genomformen (58). Verändert nach (212)

Attenuierte HCMV-Laborstämme wie AD169 oder Towne unterscheiden sich in ihrer Genomorganisation von klinischen Virusisolaten. Hier führte die Adaption an die Replikation in Fibroblasten zu inversen Duplikationen der R_L-Leserahmen sowie zum Verlust der Genregion um die Leserahmen UL128 - UL150 (50, 95, 213, 236). Deren Genprodukte (UL128, 130, und 131) sind für den Endo- bzw. Epithelzelltropismus essentiell. Daher findet keine produktive Virusreplikation von HCMV-Laborstämmen in Endothel- bzw. Epithelzellen statt (vgl. Abb. 2) (123, 320).

A.1.5 Der HCMV-Replikationszyklus

A.1.5.1 Der Virus-Eintritt

In vivo kann HCMV ein breites Spektrum an Zellen wie Parenchymzellen, Zellen des Bindegewebes, hämatopoetische Zellen, Epithelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten und Muskelzellen infizieren (234, 275, 280). Dieser breite Zelltropismus führte zu der

Vermutung, dass das Virus den *platelet-derived growth factor alpha receptor* (PDGFR-alpha) - in Kombination mit zellfusionvermittelnden Integrinen - für die Virusadsorption verwendet (100, 101, 285, 323). Daneben wurde auch der *epithelial growth factor receptor* (EGFR) als essentiell für die Virusadsorption beschrieben, später jedoch wieder in Frage gestellt (143, 324). Der Viruseintritt (*entry*) erfolgt zelltypspezifisch. Bei Fibroblasten vermittelt das virale Glykoprotein gB (UL55) das Andocken (*attachment*) des viralen Partikels über unspezifische Bindungen an die Heparansulfat-Proteoglykane der Wirtszelle (39, 71). Nach der Bindung von gB an den Wirtszellrezeptor erfolgt die pH-unabhängige Fusion der Virushülle mit der Zellmembran über *coiled-coil*-Domänen von gB (UL55) und gH (UL75). Über diesen Prozess gelangt das Nukleokapsid mit den Tegumentkomponenten in das Zytoplasma der Wirtszelle (*entry*) (vgl. Abb. 3) (30, 72, 130, 142, 272). In retinalen Pigmentepithelzellen (RPE-1) bzw. Endothelzellen konnte darüber hinaus eine rezeptorvermittelte Endozytose beobachtet werden (vgl. Abb. 3) (26, 279).

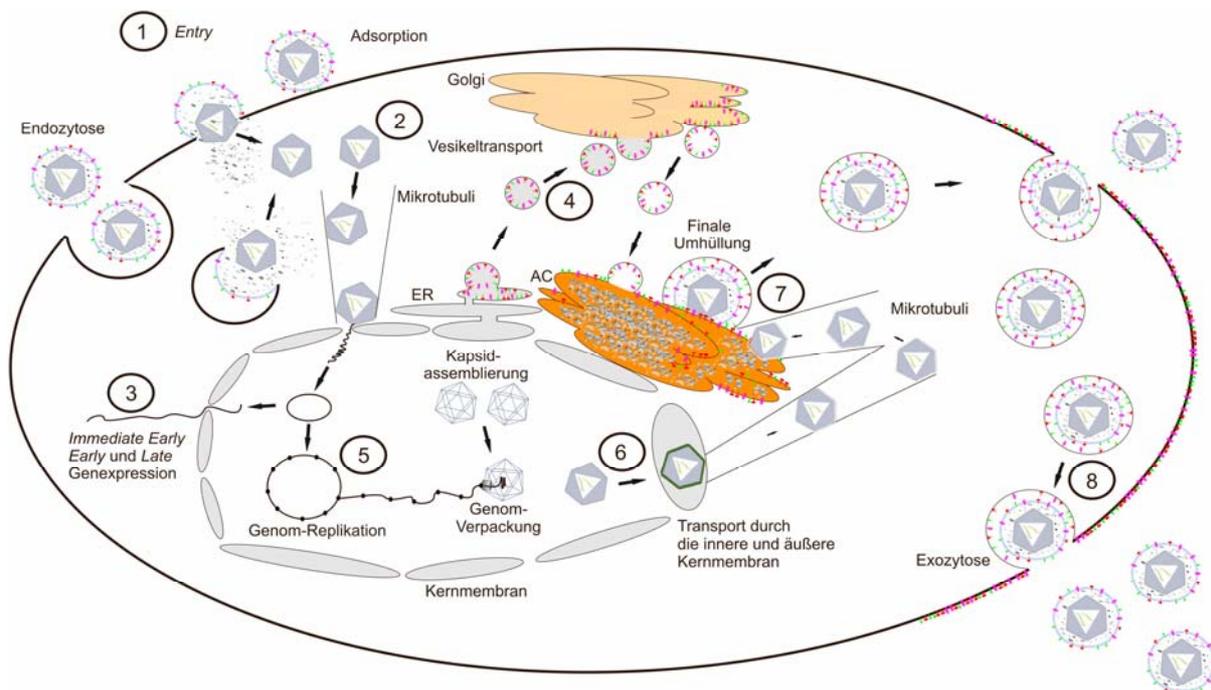


Abb. 3: Der HCMV-Replikationszyklus

(1) Nach der Adsorptionsphase gelangt das Viruspartikel über Endozytose oder eine pH-unabhängige Fusion der Virushülle und der Zellmembran in das Zytoplasma (*entry*). (2) Das Nukleokapsid wird nach seiner Freisetzung zum Zellkern transportiert, wo es an die Kernporen bindet. Dort wird das virale Genom in den Zellkern entlassen, wo es zirkularisiert. (3) Die Transkription des viralen Genoms erfolgt nach einem dreiphasigen Expressionszyklus, aufgeteilt in die sehr frühe (*immediate-early*, IE), frühe (*early*, E) und späte (*late*, L) Phase.

Abb. 3: Fortgesetzt

(4) Die posttranslationale Modifikation viraler Proteine erfolgt im endoplasmatischen Retikulum (ER) und im Golgi-Apparat. Von dort gelangen die viralen Proteine zum *assembly compartment* (AC). (5) Nach der *rolling-circle* DNA-Replikation wird das resultierende DNA-Konkatemer von dem Terminasekomplex prozessiert. Dieser bindet an das Prokapsid und schleust die virale genomische DNA in das Nukleokapsid. (6) Das mit dem viralen Genom befüllte Nukleokapsid gelangt über Knospung durch die innere (INM) und äußere Kernmembran (ONM) in das Zytoplasma. (7) Von dort gelangt das Nukleokapsid zum AC, wo die zytoplasmatische Tegumentisierung erfolgt und das Nukleokapsid seine Virushülle erhält. (8) Nach dem Transport zur Zellmembran werden die reifen Viruspartikel durch Exozytose freigesetzt.

Im Zytoplasma angelangt, wird das Nukleokapsid mit Hilfe des Mikrotubuli- und Vimentin-Zytoskeletts zu den Kernporen des Zellkerns transportiert (208, 224). Das Nukleokapsid bindet an die Kernporen, wonach es über einen unbekanntenen Mechanismus dissoziiert (*uncoating*). Das virale Genom wird bei diesem Prozess zusammen mit regulatorischen Proteinen in den Zellkern eingeschleust, wo es zu einem Episom zirkularisiert (vgl. Abb. 3) (301).

A.1.5.2 Die virale Genexpression

Die Transkription des viralen Genoms erfolgt nach einem für alle Herpesviren charakteristischen, dreiphasigen, kaskadenartigen Expressionszyklus und wird in eine sofort- (*immediate-early*, IE), früh- (*early*, E) und späte- (*late*, L) Phase der viralen Genexpression unterteilt (vgl. Abb. 4) (135, 325).

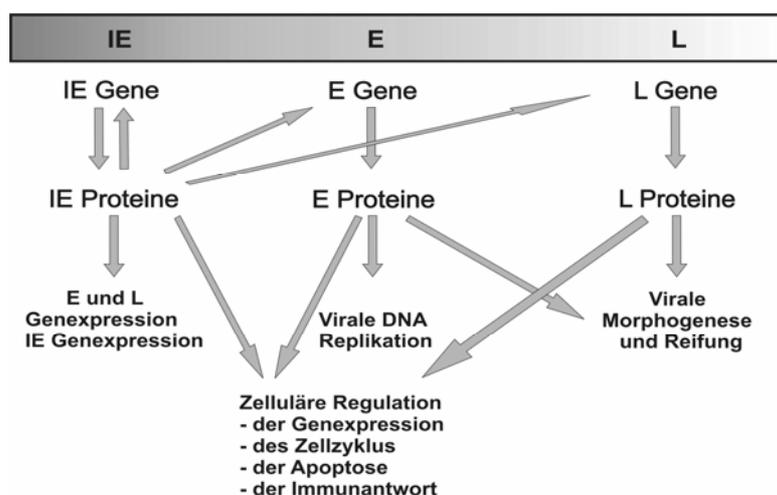


Abb. 4: Die virale Genexpression und Funktion der viralen Proteine im Rahmen des HCMV-Replikationszyklus

Verändert nach (174)

Die IE-Phase beginnt mit dem Eintreten der viralen DNA in den Zellkern. Die Aktivierung der viralen IE-Promotoren erfolgt durch zelluläre Transkriptionsfaktoren und ist unabhängig von der Neusynthese viraler Proteine. Dabei spielen die viralen Tegumentproteine pp71 und pUL69, die bei der Virus-Zell-Fusion in die Zelle eingebracht wurden, als Transaktivatoren eine unterstützende Rolle (vgl. Abb. 4) (281). IE-Gene kodieren hauptsächlich für regulatorische Genprodukte (36, 197). Diese regulieren zelluläre und virale Promotoren und steuern so die Transkriptionsaktivität der Zelle sowie die *early*- und *late*-Genexpression (87, 175). In der E-Phase wird die virale Genexpression durch virale und zelluläre Transkriptionsfaktoren aktiviert (vgl. Abb. 4). Die Gene der E-Phase kodieren größtenteils für Proteine, die für die virale DNA-Replikation benötigt werden. Darüber hinaus werden unter anderem Proteine der Immunevasion sowie regulatorische Proteine für die *late*-Phase exprimiert (8, 25, 139, 182, 183, 210).

Ein charakteristisches Merkmal der E-Phase ist die virale DNA-Replikation (vgl. Abb. 4) (210). Mit der viralen DNA-Synthese beginnt die späte Phase der Virusreplikation, in der die *early-late*- und *true-late*-Proteine transkribiert werden. Dabei wird parallel zur DNA-Synthese die *early-late*-Genexpression aktiviert, während die *true-late*-Proteine erst nach Abschluss der DNA-Replikation exprimiert werden (vgl. Abb. 4) (248). Die Gene für die L-Proteine kodieren größtenteils für Proteine, die für die Virusmorphogenese und Virusreifung erforderlich sind. So werden unter anderen die Strukturproteine des viralen Nukleokapsids und virale Tegumentproteine exprimiert (112, 157, 163).

A.1.5.3 Die Struktur und Assemblierung des Nukleokapsids

Die Morphogenese der Viruspartikel beginnt mit dem Aufbau des viralen Nukleokapsids. Wie bei allen Herpesviren besteht das Nukleokapsid aus 162 Kapsomeren (150 Hexonen und zwölf Pentonen), die einen Ikosaeder bilden (vgl. Abb. 5 A) (46, 56). Dem reifen HCMV-Nukleokapsid mit einer Größe von ca. 130 nm, wurden bisher sechs strukturelle Proteinkomponenten zugeordnet (46, 56, 112). Hauptbestandteile sind das *major capsid protein* (MCP, pUL86) mit 960 und das *small capsid protein* (SCP, pUL48-49) mit 900 Kopien.

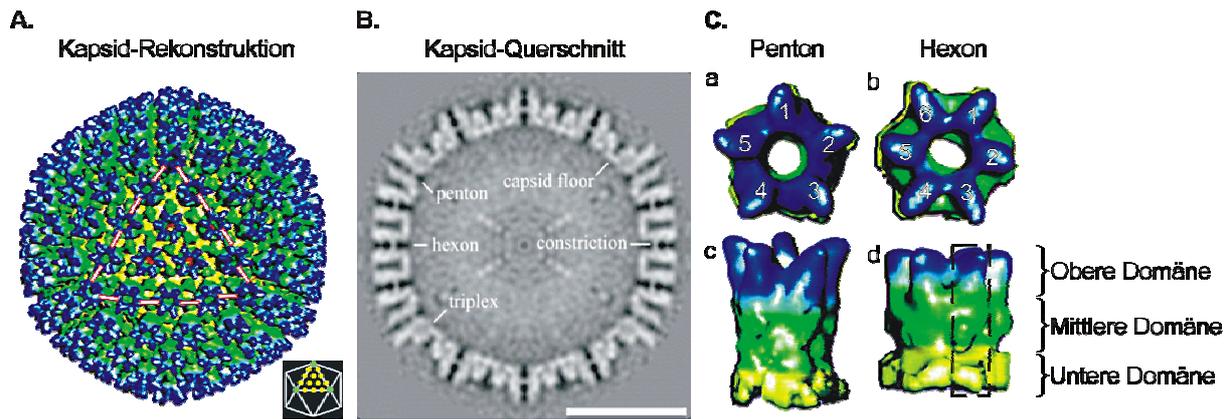


Abb. 5: Struktur des HCMV-Nukleokapsids

(A) Aufsicht auf die zweifache Symmetrieachse des ikosaedrischen Nukleokapsids. Die Anordnung eines Dreiecks des Ikosaeders ist gestrichelt unterlegt (vgl. A, kleine Abb.). Das Nukleokapsid wurde radial koloriert. Die oberen, zur Oberfläche exponierten Domänen der Pentone und Hexone - bestehend aus fünf bzw. sechs Monomeren des *major capsid proteins* (MCP/pUL86) - sind blau dargestellt. Die verbindenden Triplexe - bestehend aus zwei Einheiten des *minor capsid proteins* (MnCP, pUL85) und dem *minor capsid binding protein* (MnCP-bp, pUL46) - lokalisieren im mittleren Bereich der Nukleokapsidhülle und sind grün, der innere Bereich der Nukleokapsidhülle ist gelb dargestellt.

(B) Ultradünnschnitt durch die Rekonstruktion eines HCMV-Nukleokapsids. Die Balkenlänge entspricht 50 nm.

(C) Vergleich der Struktur einzelner Pentone (a) und Hexone (b) des HCMV-Nukleokapsids. Die Pentone und Hexone sind analog zu A radial koloriert. Die obere exponierte MCP-Domänenstruktur ist blau, die mittlere Domäne grün und die untere Domäne gelb dargestellt. Verändert nach (46, 343)

Zwei Kopien des *minor capsid proteins* (MnCP, pUL85), verbunden mit einer Kopie des *minor capsid binding proteins* (MnCP-bp, pUL46), bilden ein Trimer, das sogenannte Triplex. Hiervon befinden sich insgesamt 320 zwischen den Pentonen und Hexonen der Ikosaeder (46, 56, 112, 114) (vgl. Abb. 5 A). Die Pentone und Hexone bestehen aus fünf bzw. sechs ringförmig miteinander verbundenen MCP-Monomeren (vgl. Abb. 5 C). Bei der Kapsidassemblierung lagert sich auf der Spitze eines jeden Hexon-MCP-Monomers ein *small capsid protein* an (337). Als letztes bildet das Portal-Protein pUL104 eine aus zwölf Monomeren bestehende, symmetrische Ringstruktur an dem Eckpunkt eines Kapsid-Ikosaeders. Über dessen Tunnelstruktur wird das virale DNA-Genom in das Nukleokapsid eingeschleust bzw. nach Infektion in den Zellkern entlassen (vgl. Abb. 6) (134, 218).

Die Kapsidassemblierung beginnt im Zytoplasma. Hier dimerisieren die das Strukturgerüst (*scaffold*) der Kapsidassemblierung bildenden Strukturproteine *protease precursor* (pPR, pUL80a) und *assembly protein precursor* (pAP, pUL80.5). Deren Gene liegen als 3' koterminale offene Leserahmen (*open reading frame*, ORF) vor und werden zu Proteinen mit identischem Carboxyterminus prozessiert (vgl. Abb. 6) (326, 333).

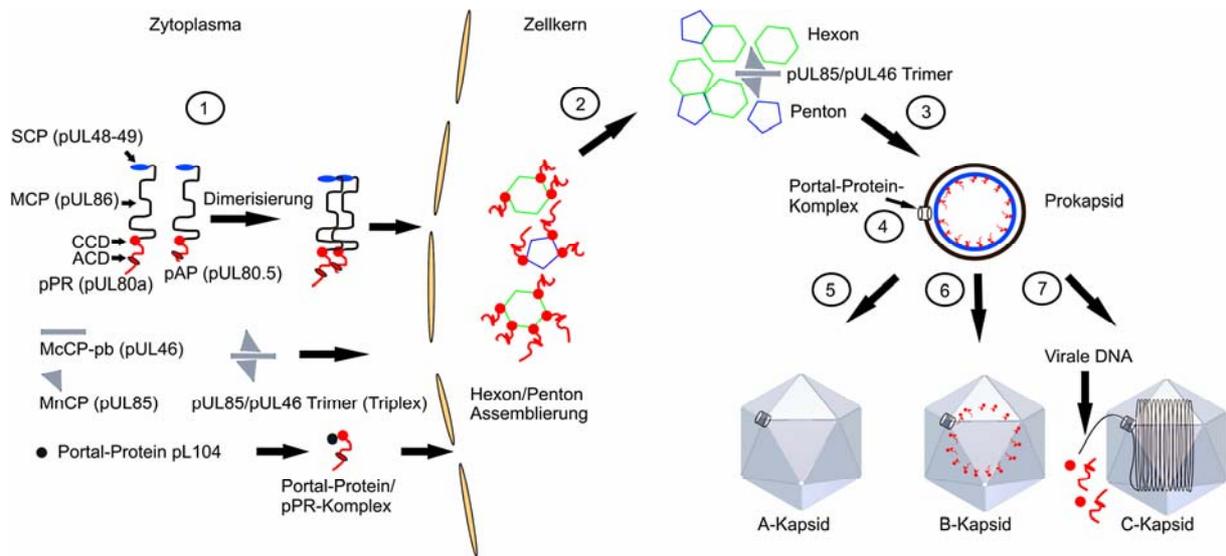


Abb. 6: Schematische Darstellung der HCMV-Nukleokapsid-Assemblierung

(1) Die Gerüstproteine (*scaffold*) pPR und pAP dimerisieren im Zytoplasma über ihre *amino terminal conserved domain* (ACD), binden über die carboxyterminale Domäne (CD) MCP - an welchem das *small capsid protein* (SCP, pUL48-49) bereits gebunden vorliegt - und translozieren in den Zellkern. Das *minor capsid protein* (MnCP) und das *minor capsid binding protein* (MnCP-bp, pUL46) translozieren als Trimer (Triplex) davon unabhängig in den Zellkern. (2) Im Zellkern initiiert das *scaffold* die Bildung von Penton- und Hexon-Strukturen. (3) Diese interagieren mit den MnCP/MnCP-bp-Trimeren (Triplexe) und bilden das transiente Prokapsid. (4) Das Portal-Protein pUL104 wird von pPR gebunden und in den Zellkern transportiert. Während der Prokapsid-Assemblierung bildet sich anstelle einer Pentonuntereinheit der aus zwölf pUL104-Monomeren bestehende ringförmige Portal-Protein-Komplex. (5) Eine spontane Angularisierung des Prokapsids, verbunden mit einem verfrühten proteolytischen Abbau des *scaffold*, unterbindet die Insertion der viralen genomischen DNA; es entstehen A-Kapside. (6) Eine verspätete proteolytische Spaltung von pPR und pAP verhindert deren Ausschleusung, wodurch das virale DNA-Genom nicht mehr in das Nukleokapsid inseriert wird und sich B-Kapside bilden. (7) Zeitgleich mit der Insertion des viralen DNA-Genoms verlässt das proteolytisch gesplattene *scaffold* das Nukleokapsid; es bilden sich die reifen C-Kapside.

Im Zytoplasma initiiert die Dimerisierung von pPR und pAP die Bindung von MCP an den pPR/pAP-Komplex (185, 333). Angenommen wird, dass bei diesem Prozess

SCP bereits an MCP gebunden vorliegt (vgl. Abb. 6) (57, 111). Unklar ist, ob sich bereits im Zytoplasma einzelne MCP/SCP-pPR/pAP-Monomere zu sogenannten *building-blocks* - bestehend aus mehreren MCP/SCP-pPR/pAP-Monomeren - verbinden (110, 112, 235). Der MCP/SCP-pPR/pAP-Komplex bzw. die *building-blocks* werden mittels der Kernlokalisationssequenzen (NLS) von pAP und pPR in den Zellkern transportiert (vgl. Abb. 6) (14, 172, 221, 333). Im Zellkern induziert eine Phosphorylierung von pAP eine verstärkte pAP-MCP Interaktion. Es wird angenommen, dass sich durch diesen Prozess einzelne *building-blocks* zu Penton- und Hexonprotomeren zusammenlagern (vgl. Abb. 6) (48, 102, 112).

Neben den schon erwähnten Proteinen aggregieren im Zytoplasma auch zwei Kopien des *minor capsid proteins* mit einer Kopie des *minor capsid binding proteins*, wonach das entstandene Trimer (Triplex) in den Zellkern transloziert (vgl. Abb. 6) (13, 113, 219). Als letztes gelangt das Portal-Protein pUL104 in den Zellkern. In Analogie zu HSV-1 wird angenommen, dass pUL104 mit pAP interagiert und als pUL104-pAP-Komplex in den Zellkern transloziert (278).

Im Zellkern assoziieren, gestützt durch das *scaffold*, die Hexon- und Pentonprotomere und bilden so das transiente Prokapsid (41, 185, 271). Eine Pentonuntereinheit wird dabei von dem aus zwölf pUL104-Monomeren bestehenden, ringförmigen Portal-Protein-Komplex ersetzt (84, 134, 271). Während dieses Prozesses interagieren die MnCP/MnCP-b-Trimere mit den Hexon- und Pentonprotomeren, wodurch sich die Struktur des Prokapsids stabilisiert (46, 56, 112, 114, 271).

A.1.5.4 Die Replikation und Verpackung des HCMV-Genoms

Die Replikation des viralen Genoms beginnt vor der Bildung des Nukleokapsids. Sie wird in Zellkultur bereits zwölf bis 24 Stunden nach Infektion in abgegrenzten, sogenannten Replikationskompartimenten des Zellkerns initiiert (2, 229). Die Replikation beginnt an einer definierten Replikationsinitiationssequenz, dem *origin of lytic replication* (*oriLyt*), und erfolgt nach dem *rolling-circle*-Prinzip. Dabei werden sogenannte *head-to-tail*-Genomkonkatemere, bestehend aus linear aneinander gereihten Kopien des viralen Genoms, gebildet (vgl. Abb. 3 und 7) (5, 36, 197, 274). Nach der Bildung des Prokapsids wird die replizierte virale genomische DNA in

einem eng mit der finalen Kapsidreifung verwobenen Prozess in das Nukleokapsid eingeschleust (vgl. Abb. 3 und 7) (133, 297).

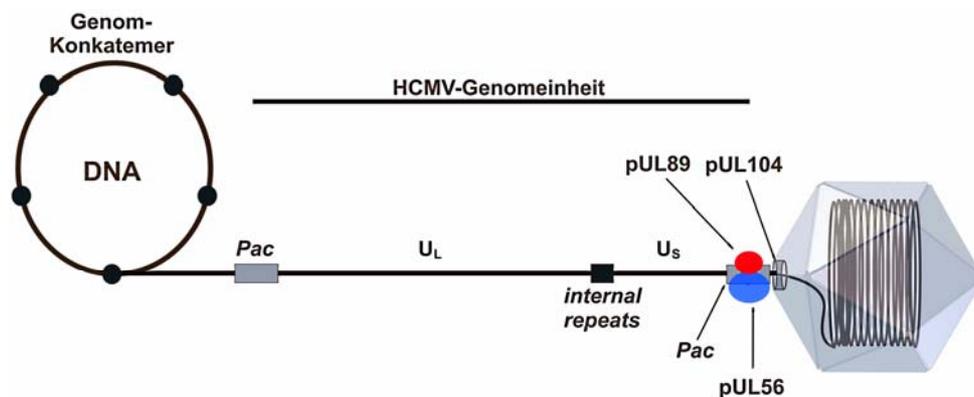


Abb. 7: Schematische Darstellung der Verpackung des viralen HCMV-Genoms in das Nukleokapsid

Der Verpackungsprozess wird durch den Terminasekomplex, bestehend aus einer großen (pUL56, 130 kDa) und einer kleinen Untereinheit (pUL89, 75 kDa), initiiert (vgl. Abb. 7) (29, 73). Für die Prozessierung und Verpackung der viralen genomischen DNA in das Prokapsid sind spezifisch im HCMV-Genom vorliegende Verpackungssequenzen, die sogenannten *a*-Sequenzen, von essentieller Bedeutung (199, 223, 287). Diese liegen an den terminalen Enden des viralen Genoms und in umgekehrter Orientierung zwischen der U_L - und U_S -Region. Innerhalb der *a*-Sequenzen befinden sich zwei hoch konservierte, kurze AT-reiche Sequenzmotive, die sogenannten *cis-acting-packaging-elements* (*Pac* 1 und *Pac* 2) (vgl. Abb. 7) (199, 223, 287).

Zu Beginn des Verpackungsprozesses erkennt und bindet ein pUL56-Dimer die AT-reichen Sequenzabschnitte der *Pac*-Region am terminalen Ende eines viralen Genoms des Genom-Konkatemers. pUL89 bindet an den pUL56-DNA-Konkatemer-Komplex, wonach das virale DNA-Konkatemer mit Hilfe der pUL89-Nuklease-Aktivität gespalten wird (217, 260). Der Protein-DNA-Komplex, der wahrscheinlich zunächst noch mehrere Genomkopien in *head-to-tail*-Anordnung hintereinander umfasst, dockt anschließend an den ringförmigen Portal-Protein-Komplex eines Prokapsids an und initiiert die Translokation der viralen genomischen DNA durch den Portal-Protein-Komplex in das Nukleokapsid (vgl. Abb. 6 und 7). Die Energie für diesen Prozess wird durch die pUL56-ATPase-Aktivität bereitgestellt (52, 85, 136). Der zweite Schritt

der DNA-Verpackung wird initiiert, wenn genau eine Genomlänge verpackt wurde (*head-full*-Mechanismus) (304). Dabei erkennt pUL56 am terminalen Ende des viralen Genoms die zweite *Pac*-Sequenz, wonach das Genommonomer sequenzspezifisch von der konkateren DNA mit Hilfe der pUL56- und pUL89-Nukleaseaktivität abgespalten wird (vgl. Abb. 7) (51, 52, 73). Neueste Daten deuten darauf hin, dass neben pUL56 und pUL89 auch das zu HSV-1 pUL33 homologe HCMV Protein pUL51 Teil des Terminasekomplexes ist. Angenommen wird, dass pUL51 den pUL56/pUL89-Komplex bereits zu Beginn der pUL56/pUL89-Interaktion stabilisiert (91).

Durch das Einschleusen der viralen DNA in das Nukleokapsid wird, in Analogie zu HSV-1, die pPR-Proteasedomäne Assemblin autokatalytisch aktiviert und spaltet sich von der *scaffold*-Domäne ab. Nachfolgend spaltet Assemblin die mit MCP verbundenen *scaffold*-Fragmente von der inneren Kapsidwand ab (vgl. Abb. 6) (102). Diese verlassen parallel zur Insertion des viralen Genoms über einen unverständlichen Mechanismus vollständig das Nukleokapsid (41, 110, 112). Bei diesem Prozess angularisiert davon unabhängig das Nukleokapsid, wodurch sich dessen Stabilität erhöht (vgl. Abb. 6) (219, 338). Nach der Verpackung des viralen Genoms wird der Portal-Protein-Komplex des DNA-beinhaltenden C-Kapsids über einen noch unverständlichen Mechanismus verschlossen (29, 136, 260).

In infizierten Zellen entstehen, ausgehend vom Prokapsid, drei unterschiedliche Kapsid-Typen, die sogenannten A-, B- und C-Kapside. A-Kapside sind DNA-frei und entstehen wahrscheinlich durch eine abortive DNA-Verpackung. B-Kapside sind DNA-freie Kapside, die noch das *scaffold* enthalten. C-Kapside stellen das reife Nukleokapsid dar und enthalten das vollständig verpackte HCMV-Genom (vgl. Abb. 6) (271, 338).

A.1.5.5 Das Ausschleusen des Nukleokapsids aus dem Zellkern

Nach dem Verpacken der viralen DNA werden die reifen Nukleokapside (C-Kapside) mittels Knospung in das Zytoplasma der infizierten Zellen transportiert (*nuclear egress*). Für diesen Prozess muss zunächst die Kernlamina, ein aus Intermediärfilamenten (Laminen) bestehendes Fasergeflecht, welches die strukturelle Integrität des Zellkerns gewährleistet, destabilisiert werden. Hierfür werden mit Hilfe

des *multi-component nuclear egress complex* (NEC), einem aus zellulären und viralen Proteinen bestehenden Komplex, die nukleären Lamine A und C phosphoryliert, was zur Destabilisierung der Kernlamina führt (94, 192, 207). Die Nukleokapside werden - gebunden an nukleäre Tegumentproteine - zu der inneren nukleären Membran (INM) transportiert, von wo sie über Knospung in den perinukleären Raum gelangen (vgl. Abb. 3) (28, 47, 131, 243, 257). Dabei wird das Nukleokapsid von der INM umhüllt. Diese Membran geht bei der anschließenden Knospung aus der äußeren Kernmembran (ONM) in das Zytoplasma wieder verloren (vgl. Abb. 3) (202, 203).

A.1.5.6 Der Zusammenbau des reifen Virions und das Ausschleusen aus der Zelle

Im Zytoplasma akkumulieren die Nukleokapside im sogenannten *assembly compartment* (AC) (vgl. Abb. 3). Das AC grenzt an die Kernmembran und besteht aus zytoplasmatischen Zisternen, die auf frühe Endosomen, den Golgi-Apparat bzw. das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) zurückzuführen sind (44, 76, 258, 268). Im AC erhalten die Nukleokapside ihre zytoplasmatische Tegumentierung. Bei der anschließenden Knospung durch die Membranen des AC werden die tegumentierten Nukleokapside mit der Virushülle versehen (49, 75, 76, 258, 268). Die Viruspartikel werden anschließend zu der Zellmembran transportiert und durch Exozytose freigesetzt (vgl. Abb. 3) (94).

Im Rahmen der HCMV-Virusreplikation werden neben DNA-haltigen infektiösen Viren auch sogenannte *non-infectious enveloped particles* (NIEPs) und *dense bodies* gebildet. NIEPs gleichen infektiösen Viruspartikeln, besitzen aber keine virale DNA. *Dense bodies* besitzen kein virales Nukleokapsid. Sie bestehen hauptsächlich aus Tegumentproteinen, die von der viralen Hüllmembran umschlossen werden (141).

A.2 Die Pathogenese des humanen Cytomegalovirus

A.2.1 HCMV-Pathogenese bei immunkompetenten Individuen

Eine HCMV-Primärinfektion verläuft bei immunkompetenten Individuen zumeist asymptomatisch. In seltenen Fällen kommt es zu einem mit einer Mononukleose vergleichbarem Krankheitsverlauf (70, 160, 161). In neuerer Literatur wird HCMV

auch mit einer begünstigten Tumorprogression, Arteriosklerose, rheumatischen Beschwerden sowie der altersbedingten Immunseneszenz in Verbindung gebracht (43, 204, 227, 232, 286).

A.2.2 HCMV-Pathogenese bei Patienten mit inkompetentem Immunsystem

Opportunistische Infektionen wie HCMV treten in Erscheinung, wenn das Immunsystem noch nicht ausgereift (fötale/neonatale HCMV-Infektion) bzw. pharmakologisch (Organtransplantation) oder durch Krankheiten supprimiert ist (z. B. AIDS), da ein funktionelles Immunsystem zur Kontrolle der HCMV-Infektion bzw. der Reaktivierung notwendig ist. Dabei sind die mit einer HCMV-Erkrankung verbundenen Krankheitssymptome maßgeblich vom Grad der Immundefizienz des Patienten abhängig. Diese können von grippeähnlichen Symptomen bis hin zur sogenannten HCMV-Endorganerkrankung, die unter anderem durch Fieber, Leukozytopenie, Hepatitis, Gastritis und Pneumonie gekennzeichnet ist, variieren (42, 180, 291, 340).

In immunsupprimierten Patienten unterscheidet man die mit der HCMV-Infektion direkt verbundenen klinischen Symptome (direkte HCMV-Effekte) von den sogenannten indirekten Effekten einer HCMV-Infektion (106). Diese sind z.B. als eine erhöhte Empfänglichkeit gegenüber Bakterien-, Pilz- und Protozoeninfektionen beschrieben oder auch mit der Wahrscheinlichkeit einer akuten bzw. chronischen Abstoßungsreaktionen des Transplantats assoziiert (99, 106, 119, 220, 255). Eine wichtige Ursache der indirekten HCMV-Effekte ist z.B. die Expression viraler immunmodulatorisch wirkender Proteine, die das ohnehin geschwächte bzw. supprimierte Immunsystem des Patienten zusätzlich beeinträchtigen (106).

A.2.2.1 Transplantationspatienten

Um Abstoßungsreaktionen zu vermeiden, wird bei Transplantatempfängern eine therapiebedingte Immunsuppression durchgeführt. Dabei ist die Inzidenz einer HCMV-Infektion bzw. Reaktivierung bei seropositiven Individuen sowie deren klinische Manifestation von verschiedenen Faktoren abhängig (292). Dazu zählen die Konstellation des Serostatus von Spender und Empfänger, die Art des transplantierten Organs sowie die Dauer und Art der Immunsuppression (292).

A.2.2.1.1 Solide Organtransplantationen (SOT)

Bei der soliden Organtransplantation (SOT) ist die HCMV-Infektion bzw. -Erkrankung eine der wichtigsten Komplikationen. Die Inzidenz variiert dabei abhängig vom transplantierten Organ. So wird bei 30 - 60% aller Nierentransplantierten eine aktive HCMV-Infektion diagnostiziert, die unbehandelt in 8 - 32% aller Fälle zu einer HCMV-Endorganerkrankung führen kann. Dagegen wird bei Herz-Lungentransplantationen in bis zu 90% aller Fälle eine HCMV-Infektion festgestellt, die bei ca. 35% in einer symptomatischen HCMV-Endorganerkrankung endet (228). Ein hohes HCMV-Infektionsrisiko besteht bei serologischen Inkompatibilitäts-Transplantationen. Dabei sind seronegative Patienten (R-), denen ein HCMV-seropositives Organ (D+) transplantiert wird, besonders gefährdet (292). Hier kann durch das übertragene HCMV-positive Organ eine HCMV-Primärinfektion im immunologisch naiven Empfänger erfolgen, die zu schweren Schädigungen des Organismus und des Transplantats führen kann (107, 250, 251, 292). Bei seropositiven Transplantatempfängern (R+) kann es zudem zu einer HCMV-Reaktivierung kommen. Da das Virus dem Immunsystem jedoch bereits bekannt ist, kommt es hier meist zu einer mildereren Ausprägung der klinischen Symptomatik (292). Darüber hinaus können HCMV-seropositive Empfänger von seropositiven Organen (D+/R+) an einer donorinduzierten HCMV-Superinfektion erkranken (107, 250, 251, 292). Insbesondere in der frühen Phase nach der Transplantation kommt es vermehrt zu HCMV-Infektionen, da hier eine effiziente Immunsuppression angestrebt wird, um Organabstoßungen zu vermeiden (228). In der Folge manifestiert sich die HCMV-Erkrankung häufig im jeweils transplantierten Organ. So tritt bei Lungentransplantationen die HCMV-Pneumonie und bei Lebertransplantationen die HCMV-Hepatitis häufig in Erscheinung (228).

A.2.2.1.2 Allogene Knochenmarktransplantationen

Bei allogenen Knochenmarktransplantationen ist das Risiko einer HCMV-Infektion bzw. -Erkrankung ebenfalls mit dem Serostatus von Spender und Empfänger verbunden. Im Gegensatz zur SOT ist das Risiko jedoch hier mit dem Serostatus des Empfängers assoziiert. So wird bei ca. 80% der seropositiven Empfänger eine HCMV-Reaktivierung diagnostiziert, wovon unbehandelt 20 - 35% eine HCMV-Endorganerkrankung erleiden (228). Im Vergleich ist das Risiko bei der Serokonstellation D+/R- wesentlich geringer. Hier tritt nur bei ca. 30% eine HCMV-

Infektion auf, die bei 0 - 20% zu einer HCMV-Endorganerkrankung führt (181, 228). Bei Knochenmarktransplantationen ist die interstitielle Pneumonie die am häufigsten auftretende HCMV-Endorganerkrankung. Sie wird bei ca. 30% der auftretenden HCMV-Infektionen diagnostiziert und ist unbehandelt mit einer hohen Mortalitätsrate verbunden (228).

A.2.2.2 Patienten mit erworbenem Immundefizienz-Syndrom (AIDS)

Die HCMV-Infektion gehört zu den häufigsten opportunistischen Infektionen bei HIV-Patienten (88). Unbehandelt besteht insbesondere im späten Stadium der HIV-Infektion (AIDS-Stadium) im Zuge der HIV-induzierten Immunsuppression ein erhöhtes Risiko einer HCMV-Infektion bzw. -Erkrankung (87, 88, 295). In der Ära vor der Etablierung der hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) erkrankten im späten AIDS-Stadium mehr als 50% der HIV-infizierten Patienten an HCMV (289). Die bei AIDS-Patienten mit einer HCMV-Infektion auftretenden Erkrankungen, wie nekrotisierende Retinitis und Gastroenteritis, gingen insbesondere durch die Einführung der HAART in den Industriestaaten zurück (81). HAART führte zu einer partiellen Regeneration des Immunsystems und damit zur Kontrolle der HCMV-Infektion. Ernsthafte mit HCMV verbundene Komplikationen treten nach wie vor bei HAART-resistenten bzw. bei zu spät oder unregelmäßig mit HAART behandelten HIV-Infizierten auf (295). Trotz HAART wurde in Studien bei mehr als 12% der HIV-Infizierten eine HCMV-Virämie diagnostiziert, die als Risikofaktor einer fortschreitenden Entwicklung von AIDS, verbunden mit frühzeitigem Tod, gewertet wird (82).

A.2.2.3 Kongenital infizierte Neugeborene

Mit ca. 0,6 - 0,7% ist die kongenitale HCMV-Infektion von Neugeborenen die häufigste kongenitale virale Infektion in den Industrieländern (86). Die Transmission des Virus erfolgt überwiegend nach einer primären HCMV-Infektion der Mutter, die bei ca. 30 - 40% in einer intrauterinen Infektion des Fötus mündet. Pränatal kann sich eine HCMV-Infektion besonders schwerwiegend manifestieren, da das Immunsystem des Fötus noch nicht ausreichend entwickelt ist, um das Virus zu kontrollieren (32, 33, 226). Die Schwere der Spätfolgen ist dabei vom Zeitpunkt der Infektion des Fötus sowie der Viruslast abhängig. Föten im ersten und zweiten Drittel der Schwangerschaft sind besonders gefährdet (32, 231).

Ca. 13% aller kongenital infizierten Neugeborenen entwickeln unmittelbar nach der Geburt eine symptomatische HCMV-Infektion (86). Diese ist unter anderem mit sensorischer Taubheit, Sehfeldverlust, Mikrozephalie sowie kognitiven und motorischen Defiziten verbunden (86, 261). Während ca. 0,5% dieser Neugeborenen kurz nach der Geburt versterben, entwickeln 40 - 58% dieser Kinder sowie bis zu 13,5% der asymptomatisch infizierten Neugeborenen in den ersten Lebensjahren schwerwiegende Spätfolgen, die mit geistiger Retardierung, sensorischer Taubheit, neurologischen Schäden und anderen Erkrankungen einhergehen können (86).

A.3 Die antivirale Therapie einer HCMV-Infektion/Erkrankung

Da in dieser Arbeit ausschließlich mit antiviralen Substanzen gearbeitet wurde, wird auf die Prävention von HCMV mittels einer Impfung bzw. den derzeitigen Stand der HCMV-Vakzine-Entwicklung nicht gesondert eingegangen. Bis zum heutigen Tag ist kein zugelassener HCMV-Impfstoff verfügbar. Allerdings befinden sich verschiedene HCMV-Impfstoffe in der präklinischen und klinischen Entwicklung, bei denen unter anderem lebend attenuierte Viren, virale Glykoproteine, virale DNA bzw. *dense bodies* als Immunstimulator verwendet werden (262, 263, 300).

A.3.1 Prophylaktische und präemptive Therapie und Behandlung

Für die Behandlung oder Prävention einer HCMV-Infektion bzw. -Erkrankung wurden verschiedene Behandlungsstrategien, basierend auf der therapeutischen Wirksamkeit sowie dem Toxizitätsprofil der vorhandenen antiviralen Substanz, entwickelt.

Bei der prophylaktischen Therapie wird eine antivirale Substanz schon vor Beginn einer aktiven HCMV-Infektion bzw. HCMV-Reaktivierung verabreicht. Der Vorteil liegt neben der Kontrolle der HCMV-Infektion in der Bekämpfung der indirekten Effekte einer HCMV-Infektion. Nachteilig ist, dass eine prophylaktische Therapie zur einer Verschiebung der HCMV-Erkrankung auf eine Zeit nach der antiviralen Prophylaxe führen kann (*late-onset disease*) (158, 282). Da sich das Immunsystem in Folge einer Verringerung der transplantationsbedingten Immunsuppression zu diesem Zeitpunkt in gewissen Grade rekonstituiert hat, verläuft diese jedoch zumeist milder (158, 282).

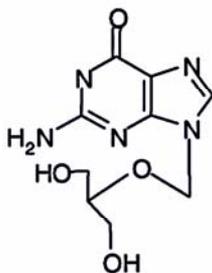
Die präemptive Therapie basiert auf der Erkenntnis, dass einer HCMV-Erkrankung in der Regel eine asymptomatische aktive HCMV-Replikation (Virämie) vorausgeht. So werden bei dem Nachweis einer akuten Virämie im Rahmen der präemptiven Therapie, vor dem Auftreten klinischer Symptome, antivirale Substanzen verabreicht (27). Die Vorteile liegen in einem relativ kurzen Behandlungszeitraum, weshalb auch Substanzen mit einem ungünstigeren Toxizitätsprofil, verbunden mit einer hohen antiviralen Wirksamkeit, verabreicht werden können (27).

Im Falle einer manifestierten HCMV-Erkrankung wird eine antivirale Therapie mit denselben antiviralen Substanzen durchgeführt, die in der präemptiven Therapie verwendet werden. Im Vergleich wird allerdings eine höhere Dosierung angewandt (27).

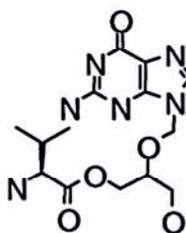
A.3.2 Zugelassene Anti-HCMV-Substanzen

Für die Behandlung und Prävention einer HCMV-Infektion oder -Erkrankung sind derzeit fünf antivirale Medikamente zugelassen, wovon allerdings keines für die Behandlung der kongenitalen HCMV-Infektion zugelassen ist: Ganciclovir (GCV) und sein L-Valylester Valganciclovir (VGCV), Foscarnet (FOS), Acyclovir (ACV) und sein L-Valylester Valacyclovir (VACV) und Cidofovir (CDV) (vgl. Abb. 8) (200).

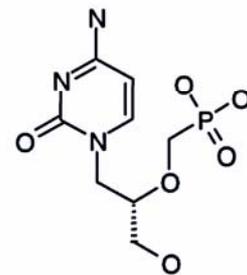
Ganciclovir



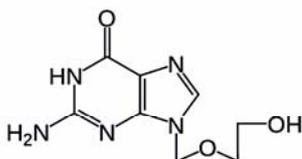
Valganciclovir



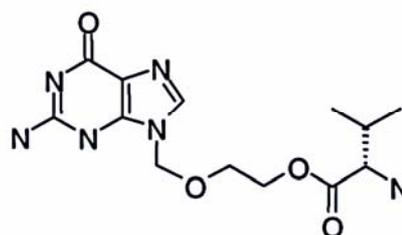
Cidofovir



Acyclovir



Valacyclovir



Foscarnet

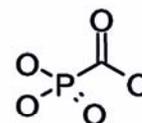


Abb. 8: Molekülstrukturen der zugelassenen antiviralen HCMV-Substanzen

Entnommen aus (179)

A.3.2.1 Ganciclovir und Valganciclovir

Als erste Wahl und Goldstandard zur prophylaktischen und präemptiven Behandlung einer HCMV-Infektion bzw. zur Behandlung einer HCMV-Erkrankung werden Ganciclovir bzw. Valganciclovir (GCV; Cymeven1, Roche/VGCV; Valcyte1; Roche) verwendet (vgl. Abb. 8) (37, 191, 238, 306). Das azyklische 2'-Desoxyguanosin-Nukleosid-Analogon Ganciclovir wird dabei intrazellulär von der viralen Proteinkinase UL97 monophosphoryliert und verbleibt ladungsbedingt in der Zelle. Nach Di- und Triphosphorylierung durch zelluläre Kinasen wird GCV-Triphosphat während der DNA-Replikation kompetitiv als Substrat der viralen DNA-Polymerase pUL54 eingebaut. Dabei verlangsamt es die DNA-Polymerisation bzw. führt zu deren Abbruch (124, 200). Die L-Valyl-Veresterung von Ganciclovir zu Valganciclovir führte zu einer verbesserten oralen Bioverfügbarkeit, weshalb VGCV GCV in der klinischen Anwendung größtenteils ersetzt (330). Zu den wichtigsten Nebenwirkungen von GCV und VGCV werden unter anderem dosisabhängige myelosuppressive Effekte gezählt (179). Darüber hinaus wurde in Tierversuchen gezeigt, dass GCV dosisabhängig kanzerogen, mutagen und embryotoxisch wirken kann (19, 129, 309).

A.3.2.2 Foscarnet

Foscarnet (FOS; Foscavir1, Astra-Zeneca) wird als Ersatzmedikament bei GCV-resistenten Virusstämmen bzw. GCV-Unverträglichkeiten angewandt (vgl. Abb. 8) (115, 171, 264). Foscarnet ist ein Struktur analogon des Pyrophosphats. Es bindet reversibel und nicht kompetitiv an die Bindungsstelle des Pyrophosphats der viralen DNA-Polymerase und inhibiert die Pyrophosphatabspaltung am terminalen Nukleosidtriphosphat während der viralen DNA-Replikation. Foscarnet benötigt für seine antivirale Wirksamkeit keine intrazellulären Modifikationen (68, 318). Foscarnet ist eine toxische Verbindung, die fast alle Organsysteme schädigen kann. So kommt es bei bis zu 30% der mit Foscarnet behandelten Patienten zu schweren Nierenschädigungen verbunden mit einer Niereninsuffizienz. Darüber hinaus beeinflusst Foscarnet den Gastrointestinaltrakt und ist stark neurotoxisch (144, 145, 173, 294).

A.3.2.3 Cidofovir

Das azyklische Desoxycytidin-Monophosphat Nukleotid-Analogon Cidofovir (CDV; Vistide¹, Gilead) ist nur für die intravenöse Infusion zur Behandlung einer HCMV-Retinitis zugelassen (vgl. Abb. 8). Außerdem wird CDV wie Foscarnet als Ersatzmedikament im Fall von auftretenden GCV-induzierten Resistenzen bzw. -Unverträglichkeiten angewandt (115, 264). CDV inhibiert neben HCMV auch andere doppelsträngige DNA-Viren (80, 284). Bereits als Monophosphat vorliegend, wird CDV zur Erhaltung seiner antiviralen Aktivität von zellulären Kinasen zum Diphosphat phosphoryliert (6, 186). CDV führt wie die Nukleosid-Analoga zum Abbruch der Elongation der viralen DNA-Synthese. Die Anwendung von Cidofovir ist aufgrund gravierender Nebenwirkungen stark eingeschränkt. So ist Cidofovir unter anderem stark nephrotoxisch und kann z.B. schon nach einmaliger Verabreichung zu akutem Nierenversagen führen. In Tierexperimenten wurde für Cidofovir eine kanzerogene, terratogene und embryotoxische Wirkung nachgewiesen (19, 129, 173, 294, 309, 317).

A.3.2.4 Acyclovir und Valacyclovir

Das 2'-Desoxyguanosin-Analogon ACV bzw. VACV (VACV, Valtrex¹, GlaxoSmithKline) wird wie GCV phosphoryliert, wodurch es seine aktive antivirale Struktur erhält (vgl. Abb. 8). Acyclovir-Triphosphat inhibiert wie GCV die Polymerisation der viralen DNA (319). Auch hier wurde die orale Bioverfügbarkeit durch eine L-Valyl-Veresterung von ACV zu VACV deutlich verbessert. Sowohl Acyclovir als auch Valacyclovir besitzen für die Behandlung einer akuten HCMV-Infektion bzw. -Erkrankung keine ausreichende antivirale Potenz (186). Daher ist Valacyclovir in verschiedenen Staaten nur für eine prophylaktische Therapie zugelassen (80, 186).

A.3.3 Resistenzentwicklung gegen zugelassene Anti-HCMV-Substanzen

Eine über längere Zeit andauernde bzw. unzureichende antivirale Therapie mit den derzeit für die Behandlung und Prävention einer HCMV-Infektion bzw. -Erkrankung zugelassenen Polymeraseinhibitoren kann zur Selektion resistenter HCMV-Stämme führen. So kann bei Risikopatienten der SOT (D+/R-), abhängig vom transplantierten Organ und der Immunsuppression, bei 5 - 10% der Patienten eine GCV-Resistenz auftreten (188). Diese wird durch Mutationen entweder in der Proteinkinase pUL97

und/oder der viralen DNA-Polymerase pUL54 vermittelt (4, 11, 12). Ganciclovir-Resistenzmutationen in pUL97 vermitteln keine Cidofovir- bzw. Foscarnet-Kreuzresistenz, da für deren antivirale Aktivität keine pUL97-Monophosphorylierung erforderlich ist. Dagegen können GCV-pUL54-Resistenzmutationen zu einer Cidofovir- bzw. Foscarnet-Kreuzresistenz führen, was die Behandlung einer HCMV-Infektion bzw. -Erkrankung erschwert oder unmöglich machen kann (11, 24, 66, 125, 303).

Aufgrund der stetigen Zunahme resistenter HCMV-Stämme ist die Entwicklung von potenten und oral gut verträglichen, neuartigen Anti-HCMV-Substanzen dringend erforderlich.

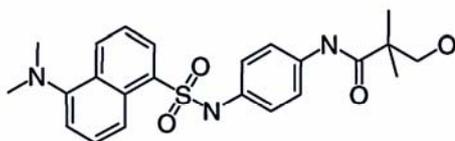
A.3.4 Anti-HCMV-Substanzen, deren klinische Entwicklung eingestellt wurde

In den vergangenen Jahren erreichten verschiedene Anti-HCMV-Substanzen die klinische Entwicklung; sie wurden jedoch unter anderem aufgrund von metabolischer Instabilität und mangelnder antiviraler Wirksamkeit nicht weiterentwickelt.

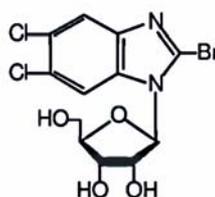
A.3.4.1 HCMV-Terminaseinhibitoren

Zwei antivirale HCMV-Substanzklassen interferieren mit der Prozessierung und Verpackung der viralen genomischen DNA in das Nukleokapsid (vgl. A.1.5.4): Die Phenylendiamin-Sulfonamide (Bay 38-4766) und die Benzimidazol-Riboside (BDCRB, TCRB) sowie das davon abgeleitete D-Ribopyranosil-Nukleosid GW275175X (vgl. Abb. 9).

Bay 38-4766



BDCRB



GW275175X

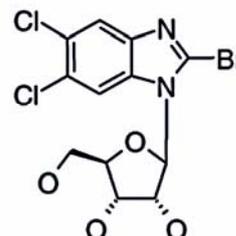


Abb. 9: HCMV-Terminaseinhibitoren.

Verändert nach (20)

Aus der Klasse der Phenylendiamin-Sulfonamide wurde die Leitstruktur Bay 38-4766 (Tomeglovir1, Bayer AG) entwickelt (vgl. Abb. 9). Bay 38-4766 besitzt sowohl gegen

humanes als auch gegen Primaten- und Nager-CMV eine ausgezeichnete antivirale Aktivität (244). Resistenz-vermittelnde Mutationen wurden in der großen und kleinen Untereinheit der viralen Terminase (pUL56 und pUL89) lokalisiert (45). Klinische Phase-I-Studien demonstrierten eine gute Verträglichkeit beim Menschen. Die weitere Entwicklung wurde jedoch aufgrund unerwarteter pharmakokinetischer Probleme eingestellt (vgl. Abb. 9).

Auch bei den Benzimidazol-Ribosiden BDCRB und TCRB wurden in beiden Terminaseuntereinheiten Resistenzmutationen festgestellt. So wurden in pUL89 BDCRB- und in pUL56 und pUL89 TCRB-Resistenzmutationen identifiziert (169, 313). Bekannt ist, dass BDCRB mit der pUL56-ATPase-Aktivität sowie mit der pUL56-Portal-Proteinkomplex-Interaktion interferiert (85, 137). Die klinische Entwicklung wurde eingestellt, da BDCRB metabolisch instabil ist. Modifizierungen der BDCRB-Struktur führten zu der Synthese von GW275175X, einem D-Ribopyranosil-Nukleosid mit erhöhter Stabilität und verbesserten pharmakokinetischen Eigenschaften (vgl. Abb. 9). GW275175X bewies ebenso wie sein Vorläufer BDCRB eine gute antivirale Aktivität bei gleichem inhibitorischen Wirkmechanismus. Trotz eines vielversprechenden Toxizitätsprofils wurde die Entwicklung von GW275175X nach der klinischen Phase I zugunsten der Entwicklung von Maribavir eingestellt (6, 179).

A.3.4.2 Maribavir

Versuche, die pharmakokinetischen Eigenschaften der Benzimidazol-Riboside zu optimieren, führten neben der Synthese von GW275175X zu der Synthese von Maribavir (ViroPharma), einem B-L-Ribofuranosyl BDCRB-Derivat (vgl. Abb. 10).

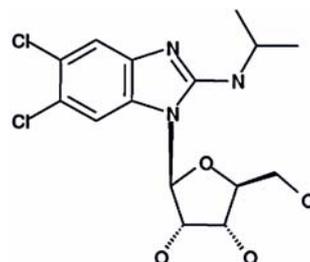


Abb. 10: Maribavir

Verändert nach (20)

Der Wirkmechanismus von Maribavir unterscheidet sich von dem der Terminaseinhibitoren, da die Substanz nicht mit dem Verpackungsprozess der viralen DNA interferiert, sondern die Synthese der viralen genomischen DNA sowie den nukleären *egress* inhibiert (vgl. A.1.5.5) (167). Genotypisierungen resistenter Viren identifizierten die virale Proteinkinase pUL97 als Haupt-Zielmolekül, deren Kinaseaktivität durch Maribavir inhibiert wird (21, 67). pUL97 phosphoryliert den Prozessivitätsfaktor der viralen DNA-Polymerase pUL44, was die Maribavir-induzierte Inhibition der viralen DNA-Replikation erklären könnte (168). Darüber hinaus ist pUL97 Teil des *nuclear egress complex* und mitbeteiligt an der Phosphorylierung der nukleären Lamine A und C, weshalb ein Verlust dieser Aktivität den nukleären *egress* inhibiert (vgl. A.1.5.5) (192, 206, 293, 299). Obwohl die Funktionen von pUL97 für eine effiziente Virusreplikation von Bedeutung sind, ist pUL97 nicht essentiell, da dessen Funktion unter bestimmten Bedingungen von zellulären Kinasen übernommen werden kann (331).

Maribavir inhibiert EBV, HCMV und die Virusreplikation von Ganciclovir-, Cidofovir- und Foscarnet-resistenten klinischen HCMV-Isolaten und -Laborstämmen (89). Nach einer erfolgreichen klinischen Entwicklung bis zur klinischen Phase-II wurden zwei klinische Phase-III-Studien mit Knochenmark- bzw. Leber-Transplantations-Patienten durchgeführt (194, 316). Überraschenderweise wurde in beiden Studien kein signifikanter Unterschied zwischen der mit Maribavir oder Placebo behandelten Patientengruppe bezüglich der Rate an HCMV-Erkrankungen festgestellt, weshalb die weitere Entwicklung eingestellt wurde (165, 190, 194, 267, 316, 322). Vermutet wird, dass primär eine inadäquate Dosierung von Maribavir zu diesem Ergebnis beitrug (283).

A.3.5 Anti-HCMV-Substanzen in der klinischen Entwicklung

Derzeit befinden sich verschiedene Anti-HCMV-Substanzen in der klinischen Entwicklung. Dazu zählen neben den AiCuris-Substanzen, die später adressiert werden, das bereits als Malariamedikament zugelassene Artesunat, das von der Cidofovir-Struktur abgeleitete CMX001 sowie das neuartige Nukleosid-Analogon Cyclopropavir (CPV).

A.3.5.1 Artesunat

Für das schon lange als Malariamedikament zugelassene Artesunat (ART, Arinate®; Dafra-Pharma) konnte eine antivirale Aktivität gegen verschiedene Herpesviren wie HSV-1, EBV und HCMV nachgewiesen werden (vgl. Abb. 11) (92).

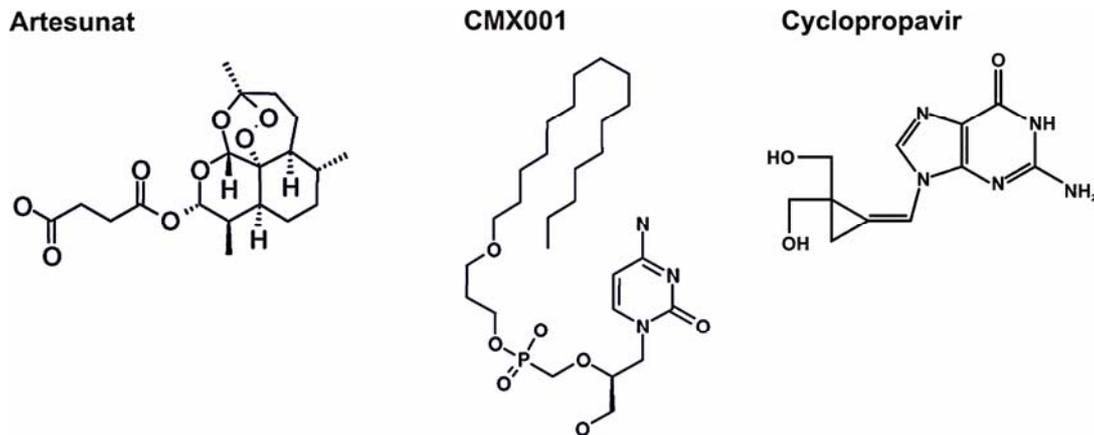


Abb. 11: Gegen HCMV antiviral aktive Substanzen in der klinischen Entwicklung

Verändert nach (109, 179)

Dabei zeigte sich, dass Artesunat wirksam gegen Ganciclovir-resistente Virusstämme ist und eine sehr gute Verträglichkeit aufweist (65, 269). Es wird angenommen, dass Artesunat seine antivirale Wirksamkeit über eine Inhibition zellulärer Signaltransduktionswege vermittelt, die sowohl für die Replikation von HCMV als auch für die Replikation HSV-1 bzw. EBV von Bedeutung sind (93, 150). Artesunat befindet sich im eigentlichen Sinne nicht in der klinischen Entwicklung. Als bereits zugelassenes Medikament wurde jedoch eine klinische Phase-III-Pilotstudie zur präemptiven Behandlung von HCMV bei sechs Stammzelltransplantations-Patienten 2010 abgeschlossen (121, 332). Bei zwei Patienten wurde nach 28 bzw. 56 Tagen der Behandlung keine HCMV-Virämie diagnostiziert. Dagegen wurde bei den anderen vier Patienten die Behandlung mit Artesunat nach sieben Tagen eingestellt, da keine antivirale Wirkung festgestellt wurde (121, 332). Die divergierende antivirale Wirkung von Artesunat soll anhand weiterer Dosis-Eskalationsstudien untersucht werden (332).

A.3.5.2 CMX001

Obwohl Cidofovir ausgezeichnete antivirale Eigenschaften gegen doppelsträngige DNA-Viren aufweist, ist seine Anwendung - bedingt durch die schlechte orale Bioverfügbarkeit, verbunden mit einer ausgesprochen hohen Nephrotoxizität - limitiert (vgl. Abb. 11) (294). Modifizierungen der Cidofovir-Struktur führten zu der Synthese des CDV-Lipid-Ester Analogons CMX001 (Hexadecyloxypropyl-CDV; HDP-CDV) (Chimerix Inc.). CMX001 weist eine im Vergleich zu CDV wesentlich verbesserte gastrointestinale Resorption auf und wird intrazellulär - analog zu CDV - zum CDV-Diphosphat anabolisiert (225). Interessanterweise zeigte sich, dass CMX001 eine im Vergleich zu CDV um mehrere Größenordnungen erhöhte antivirale Aktivität gegen Herpes- und Poxviren aufweist, was mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine im Vergleich zu CDV erhöhte intrazelluläre Substanzkonzentration zurückzuführen ist (18, 90, 155, 241, 329). Die Ursache hierfür beruht auf der im Vergleich zu CDV erhöhten intrazellulären CMX001-Konzentration, weshalb sich die Frage stellt, inwieweit die schon für CDV beschriebene kanzerogene und embryotoxische Wirkung bei CMX001 zu beobachten ist (176, 240, 321). In Zellkultur inhibiert CMX001 die Virusreplikation von Ganciclovir-, Cidofovir- und Foscarnet-resistenten klinischen HCMV-Isolaten (329). Darüber hinaus erwies sich CMX001 im Tiermodell als hochwirksam gegen Meerschweinchen CMV (*guinea-pig cytomegalovirus*, GPCMV), Maus Cytomegalovirus (MCMV) und HSV (17, 40, 155, 242). Klinische Phase-I-Studien zeigten eine sehr gute Verträglichkeit (225, 242). 2012 wurde eine klinische Phase-II-Dosis-Eskalationsstudie zur Prävention einer HCMV-Infektion in seropositiven Knochenmarktransplantierten Patienten abgeschlossen (59-63). Dabei führte CMX001 dosisabhängig zu einer statistisch signifikanten Reduktion der HCMV-Virämie im Vergleich zur placebobehandelten Kontrolle (58). Aufgrund der bisher nicht beobachteten Nephrotoxizität sowie der ausgezeichneten antiviralen Aktivität ist eine klinische Phase-III-Studie zur Prävention bzw. Behandlung einer HCMV-Infektion bzw. -Erkrankung geplant (58).

A.3.5.3 Cyclopropavir

Der neuartige Polymeraseinhibitor Mbx-400 oder Cyclopropavir (CPV) (Microbiotix Inc.) ist ein Guanin-Nukleosid-Analogon, gekoppelt an einen Methylen-Zyklopropan-Rest (vgl. Abb. 11). *In vitro* erwies sich CPV als antiviral aktiv gegen HCMV, HHV-6, und HHV-8 und zeigte im Vergleich zu GCV eine 5- bis 10-fach höhere antivirale

Potenz gegenüber MCMV und HCMV (156, 344). Zusätzlich wurde die antivirale Aktivität von CPV *in vivo* in zwei Tiermodellen nachgewiesen (154). Der CPV-Wirkmechanismus ist vergleichbar mit dem GCV-Wirkmechanismus. So wird CPV von der viralen UL97-Kinase monophosphoryliert, wonach es triphosphoryliert die virale DNA-Synthese inhibiert (108, 156). CPV resistenzvermittelnde Mutationen wurden der viralen UL97-Kinase zugeordnet und führten zu dem Auftreten von GCV-Kreuzresistenzen (10, 146, 239). Im September 2011 wurde eine klinische Phase-I-Studie zur Untersuchung von Sicherheit und Pharmakokinetik von CPV initiiert (205).

A.3.5.4 AiCuris Anti-HCMV-Substanzen AIC246, AIC2 und AIC3

Hochdurchsatzscreenings der Bayer-Substanzbibliothek identifizierten drei neuartige niedermolekulare Substanzklassen mit antiviraler Wirksamkeit gegen das humane Cytomegalovirus. Leitstrukturoptimierungen sowie präklinische Toxizitäts- und Pharmakokinetik-Studien führten zu der Identifizierung der drei chemisch nicht verwandten Entwicklungskandidaten AIC246, AIC2 und AIC3 (vgl. Abb. 12, nur veröffentlicht für AIC246) (178).

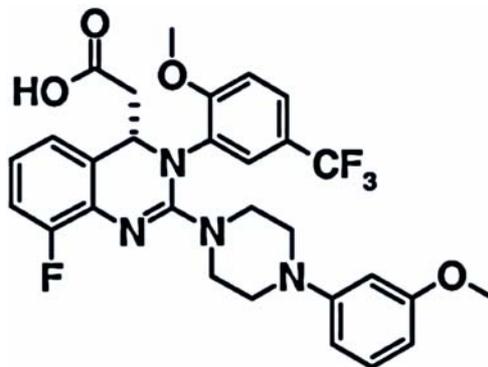


Abb. 12: Chemische Struktur von AIC246 (C₂₉H₂₈F₄N₄O₄)

Die Wirksamkeit von AIC246, AIC2 bzw. AIC3 wurde in Zellkulturexperimenten ermittelt und ergab eine im Vergleich zum Goldstandard Ganciclovir ausgezeichnete antivirale Potenz (vgl. Tab. 2) (nur veröffentlicht für AIC246) (178).

Tab. 2: Suszeptibilität des EGFP-exprimierenden AD169-Laborstamms RV-HG gegen AIC246, AIC2 bzw. AIC3 im Vergleich zu GCV in Fibroblasten

	AIC246	AIC2	AIC3	Ganciclovir
EC ₅₀ ^a [µM]	0,0040 ± 0,00078	0,0014 ± 0,00035	0,0050 ± 0,0015	1,95 ± 0,74
EC ₉₀ ^a [µM]	0,0051 ± 0,00140	0,0019 ± 0,00040	0,0110 ± 0,0027	10,7 ± 2,47

^aEC₅₀- und EC₉₀-Werte wurden über Fluoreszenzreduktions-Experimente ermittelt. Die Daten wurden mit Hilfe von nicht linearen Regressionsanalysen ermittelt, sind Mittelwerte von mindestens fünf voneinander unabhängigen Experimenten und werden mit ihrer Standardabweichung abgebildet.

So liegen die EC₅₀-Werte der AIC-Substanzen im einstelligen nanomolaren Bereich und übertreffen damit den EC₅₀-Wert von GCV um das mindestens 390-fache (vgl. AIC246: 0,004 µM; AIC2: 0,0014 µM; AIC3 0,005 µM; GCV: 1,95 µM). Ein interessantes Charakteristikum der AIC-Substanzen ist ihre steile Dosis-Wirkungskurve. Diese bewirkt, dass die EC₅₀- und EC₉₀-Werte im Gegensatz zu GCV nur geringfügig voneinander abweichen (vgl. Tab. 2 und Abb. 13).

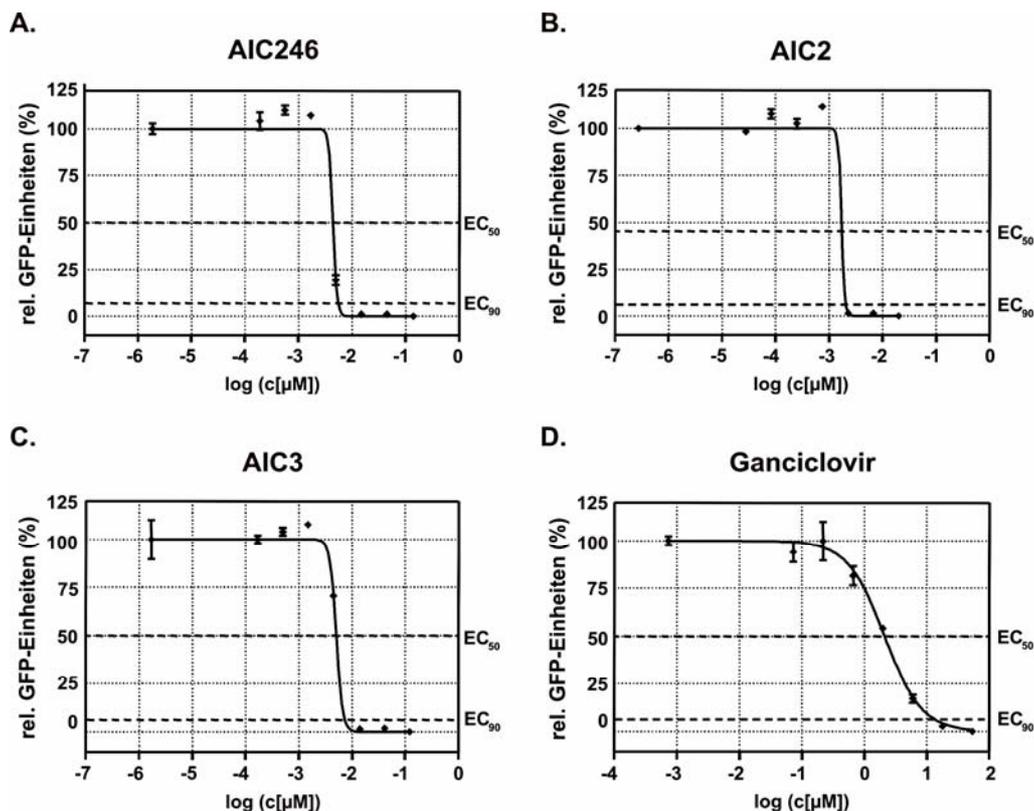


Abb. 13: Dosis-Wirkungskurven der Substanzen AIC246 (A), AIC2 (B) und AIC3 (C) im Vergleich zu Ganciclovir (D)

Charakteristisch für die antivirale Aktivität von AIC246, AIC2 bzw. AIC3 ist die jeweils steil abfallende Dosis-Wirkungskurve. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der jeweiligen Doppelbestimmung (nur veröffentlicht für AIC246) (178).

Bei der experimentellen Profilierung erwiesen sich die drei Substanzen als äußerst wirksam gegenüber zellfreien, zellassozierten sowie Ganciclovir-resistenten HCMV-Stämmen und klinischen Isolaten in verschiedenen mit HCMV infizierbaren Zelltypen, wobei in keinem Fall Zytotoxizität (Selektivitätsindex (CC_{50}/EC_{50}) in Fibroblasten ≥ 8000) beobachtet wurde (nur veröffentlicht für AIC246) (178, 193).

Aufgrund von exzellenten präklinischen Daten bezüglich der Wirksamkeit, Sicherheit, Verträglichkeit und Pharmakokinetik sind AIC246, AIC2 und AIC3 für die klinische Entwicklung vorgesehen. AIC2 und AIC3 befinden sich derzeit in der klinischen Phase I, während AIC246 in einer kürzlich abgeschlossenen klinischen Phase-IIb-Studie eine hervorragende Wirksamkeit sowie Verträglichkeit als Medikament zur Prophylaxe einer HCMV-Infektion in knochenmarktransplantierten Patienten zeigte (245).

A.4 Zentrale Techniken zur wirkmechanistischen Analyse antiviraler HCMV-Substanzen

A.4.1 Die Mutagenese von Herpesviren

Die Analyse des Wirkmechanismus einer direkt wirkenden antiviralen Substanz erfolgt insbesondere über die Generierung von substanzresistenten Viren und deren Genotypisierung. Auf diese Art und Weise können putative Resistenzmutationen identifiziert werden, die einen Aufschluss über das mögliche Zielprotein der antiviralen Substanz geben. Zur Bestätigung, dass diese so identifizierten Polymorphismen eine Substanz-Resistenz vermitteln, werden klassischerweise rekombinante Viren mit der entsprechenden Mutation generiert und funktionell analysiert (Markertransfer-Experiment). Aufgrund der Größe des herpesviralen Genoms (100 - 235 kb) finden herkömmliche Klonierungstechniken zur Insertion einer Mutation keine Anwendung (78). Frühere Verfahren erlaubten keine basengenaue Insertion von Mutationen, waren sehr aufwendig bzw. führten zu unerwünschten Mutationsereignissen (237, 259, 314).

Erst die Entwicklung von bakteriellen, artifiziellen Chromosomen (*bacterial artificial chromosomes*, BACs) ermöglichte eine von eukaryotischen Zellen unabhängige Genmanipulation großer DNA-Sequenzen, weshalb eine Vielzahl herpesviraler Genome - wie die Genome des Maus-, und des Humanen Cytomegalovirus - als

Bacmid kloniert wurde (35, 140, 201, 276, 296). Die sogenannten BACs oder Bacmide liegen in *Escherichia coli* (*E. coli*) in einfacher Kopie vor, replizieren mit Hilfe des bakteriellen F-Faktors autonom und können bis zu 300 kb an Fremd-DNA stabil aufnehmen (1, 140, 276, 296).

Genmanipulationen an herpesviralen Bacmid-Genomen erfolgen heute überwiegend über homologe Rekombinationsverfahren, wofür unter anderem das Lambda-Phagen (λ -Phage) Red-Rekombinationssystem zur Verfügung steht (215, 216, 341). Das Red-Rekombinationssystem basiert auf der homologen Rekombination von linearer DNA, welche die Mutation trägt, mit der entsprechend homologen Zielsequenz im Bacmid und besteht aus den Protein-Komponenten Exo, Beta und Gam (214, 215, 307, 339). Das Gam-Protein inhibiert die Degradierung der zu inserierenden linearen DNA, die ansonsten von *E. coli* abgebaut wird (256). Nachfolgend produziert die 5'-3' Exonuklease Exo an den linearen Enden des DNA-Fragments 3' Einzelstrang-überhänge, die von der Beta-Einzelstrang-Bindedomäne gebunden werden. Der Komplex bindet an die komplementäre Ziel-DNA. Diese wird mit Hilfe des DNA-Syntheseapparates durch das inserierte lineare DNA-Fragment ersetzt (162, 307, 335).

Mit Hilfe der Red-Rekombination wurde eine Vielzahl von Genmanipulationen an herpesviralen Genomen durchgeführt (117, 266, 307, 308). Der Vorteil liegt in der spurlosen Insertion der erwünschten Mutation (*En-passant*-Mutagenese). Daher kann anhand der rekonstituierten rekombinanten Virusmutante ausschließlich der Effekt der inserierten Mutation analysiert werden.

A.4.1 Die strukturelle Analyse von Proteinen mit Hilfe des komparativen Modelling

Die Interaktion des Inhibitors mit seinem Zielprotein oder die Position von resistenzinduzierenden Aminosäuresubstitutionen können unter anderem mit Hilfe von Strukturuntersuchungen analysiert werden. Die Struktur von Proteinen wird klassischerweise mit Hilfe der Röntgenkristallographie bzw. *Nuclear-Magnetic-Resonance*- (NMR) -Spektroskopie gelöst. In Fällen, bei denen diese Methoden nicht anwendbar sind, kann die Kryo-Elektronenmikroskopie (Kryo-EM) strukturelevante Informationen liefern. So wurde bereits im Jahr 2001 die 3D-Struktur des Rice-Dwarf-Virus (Reis-Zwerg-Virus, RDV) mit Hilfe der Kryo-EM in 6,8 Å aufgelöst. Dabei

fürten Struktur-Vorhersage-Programme wie *Helixhunter* und *Foldhunter* zur Identifizierung von strukturelevanten Sekundärstrukturelementen (148, 345).

Bei unbekanntem Proteinstrukturelement ist es möglich, mit Hilfe von komparativem Modelling die 3D-Struktur eines Proteins vorherzusagen (336). Hierbei wird zu Beginn ein Sequenzalignment der Zielprotein-Primärsequenz und einer möglichst homologen *Template*-Sequenz, für die eine 3D-Struktur existiert, erzeugt. Aufbauend auf dem Sequenzalignment und der Röntgen- bzw. NMR-Struktur des *Templates* wird anschließend ein komparatives Strukturmodell generiert. Die Qualität des Strukturmodells ist dabei von der Homologie der Primär- und Sekundärstruktur von *Template* und Zielprotein abhängig. Hoch konservierte Domänenstrukturen weisen allgemein eine hohe Güte auf, während die zumeist schlecht konservierten Loop-Strukturen häufig schwer zuzuordnen sind.

Für Strukturproteine des HCMV-Nukleokapsids wurden bisher keine Röntgenstruktur- bzw. NMR-Strukturmodelle publiziert. Allerdings wurde für HSV-1 eine Struktur des Hauptkapsidproteins VP5 publiziert, weshalb eine komparative Strukturanalyse im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt werden sollte (9, 38).

A.5 Zielsetzung der Arbeit

Das humane Cytomegalovirus (HCMV) ist ein ernst zu nehmendes Pathogen mit klinischer Relevanz bei Patienten mit supprimiertem oder defizientem Immunsystem sowie bei Neugeborenen. Alle zugelassenen Anti-HCMV-Medikamente inhibieren die virale DNA-Polymerase und sind mit schwerwiegenden Toxizitäts- und Resistenzproblematiken assoziiert, weshalb diese Substanzen auch nicht für die Behandlung der kongenitalen HCMV-Infektion zugelassen sind. Die Entwicklung potenter antiviraler Substanzen mit neuartigen Wirkmechanismen ist daher dringend erforderlich.

Hochdurchsatzscreenings und nachfolgende Leitstrukturoptimierungen führten zu den niedermolekularen antiviralen Substanzen AIC246, AIC2 und AIC3, die sich aufgrund ihrer hervorragenden Anti-HCMV-Aktivität sowie ausgezeichneter präklinischer Daten in der klinischen Entwicklung befinden.

Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung der molekularen Wirkmechanismen dieser drei HCMV-Inhibitoren.

Hierfür soll im Einzelnen der Zeitpunkt des inhibitorischen Effekts sowie der Einfluss der Inhibitoren auf die virale DNA-Replikation, Genexpression und Virusmorphogenese analysiert werden. Zusätzlich sollen mittels Genotypisierung bereits generierter AIC246-, AIC2- bzw. AIC3-resistenter HCMV-Virusstämme resistenzvermittelnde Mutationen detektiert werden, um mögliche virale Zielproteine zu identifizieren. Mit Hilfe von Markertransfer-Analysen soll anschließend getestet werden, ob bestimmte Mutationen eine antivirale Resistenz vermitteln. Dabei soll der Einfluss der Resistenzmutationen auf die Replikationskinetik von HCMV und die Suszeptibilität gegenüber den untersuchten Substanzen analysiert werden. Eine Voraussetzung hierfür ist die auf der Red-Rekombination basierende Technik der *En-passant*-Mutagenese, die im Rahmen dieser Dissertation etabliert werden soll. Um einen weiteren Einblick in den putativen Wirkmechanismus der Substanzen zu gewinnen, soll zudem eine Zuordnung der resistenzvermittelnden Mutationen in die Tertiärstruktur der Zielproteine erfolgen.

B. Material und Methoden

B.1 Material

B.1.1 Biologisches Material

Tab. 3: Verwendete Bakterienstämme (vgl. B.2.3)

<i>E. coli</i> ^a	Genotyp	Art.-Nr.
<i>dam</i> ⁻ <i>ldcm</i> ⁻	<i>ara</i> -14 <i>leu</i> B6 <i>fhu</i> A31 <i>lac</i> Y1 <i>tsx</i> 78 <i>gln</i> V44 <i>gal</i> K2 <i>gal</i> T22 <i>mcr</i> A <i>dcm</i> ⁻ 6 <i>his</i> G4 <i>rfb</i> D1 R(zgb 210::Tn 10) <i>Tet</i> S <i>end</i> A1 <i>rsp</i> L136 (<i>Str</i> R)	NEB ^b : C2925
DH10B	<i>dam</i> 13::Tn 9 (<i>Cam</i> R) <i>xyl</i> A-5 <i>mtl</i> -1 <i>thi</i> -1 <i>mcr</i> B1 <i>hsd</i> R2 F- <i>mcr</i> A ?(<i>mrr</i> - <i>hsd</i> RMS- <i>mcr</i> BC) ϕ 80 <i>lac</i> Z?M15 ? <i>lac</i> X74 <i>rec</i> A1 <i>end</i> A1 <i>ara</i> D139 ? (<i>ara</i> , <i>leu</i>)7697 <i>gal</i> IU <i>gal</i> K λ - <i>rps</i> L <i>nup</i> G /pMON14272 / pMON7124	Invitrogen: 18297
GS1783 ^c	DH10B λ <i>cl</i> 875 ?(<i>cro</i> - <i>bio</i> A)<> <i>ara</i> C-PBAD I-Sce I	/
Top-10	F- <i>mcr</i> A Δ (<i>mrr</i> - <i>hsd</i> RMS- <i>mcr</i> BC) ϕ 80 <i>lac</i> Z Δ M15 Δ <i>lac</i> X74 <i>nup</i> G <i>rec</i> A1 <i>ara</i> D139 Δ (<i>ara</i> - <i>leu</i>)7697 <i>gal</i> E15 <i>gal</i> K16 <i>rps</i> L(<i>Str</i> R) <i>end</i> A1 λ -	Invitrogen: C505003

^a*Escherichia coli*

^bNEB: New England Biolabs

^cFreundlicherweise von Greg A. Smith, Northwestern University, Chicago, USA zur Verfügung gestellt

Tab. 4: Verwendete eukaryotische Zelllinien (vgl. B.2.1)

Zelllinie	Ursprung	Art.-Nr.
HeLa	Epithelzellen aus einem humanen Zervix-Karzinom (Nelson-Rees et al., 1976)	ATCC: CCL-2
MRC-5	Aus humanen embryonalen Lungenfibroblasten abgeleitete Zelllinie (Jacobs et al., 1970)	ATCC: CCL-171
NHDF	Normale humane Hautfibroblasten	Lonza: CC-2511

Tab. 5: Verwendete Virusstämme

Virusstamm	Ursprung/Eigenschaft	Art.-Nr.
HCMV-AD169	Attenuierter HCMV-Laborstamm (Rowe et al., 1956)	ATCC: VR-538
RV-HG ^c	HCMV-AD169 mit stabil in der <i>unique short</i> Region (US) inserierter EGFP-Expressionskassette (Borst et al., 2000)	/
RV-HG-UL56-L241P ^{cd}	RV-HG mit AS-Sub ^a . an Position 241: Leucin zu Prolin	/
RV-HG-UL56-C325Y ^{cd}	RV-HG mit AS-Sub. an Position 325: Cystein zu Tyrosin	/
RV-HG-UL56-R369S ^{cd}	RV-HG mit AS-Sub. an Position 369: Arginin zu Serin	/
RV-HG-UL86-A436D ^{cd}	RV-HG mit AS-Sub. an Position 436: Alanin zu Asparaginsäure	/
RV-HG-UL86-G525D ^{cd}	RV-HG mit AS-Sub. an Position 525: Glycin zu Asparaginsäure	/
RV-HG-UL86-R583L ^{cd}	RV-HG mit AS-Sub. an Position 583: Arginin zu Leucin	/
RV-HG-UL86-R583L-Rev. ^{bcd}	RV-HG mit AS-Sub. an Position 583: Leucin zu Arginin	/
RV-HG-UL86-F1225L ^{cd}	RV-HG mit AS-Sub. an Position 1225: Phenylalanin zu Leucin	/
RV-HG-UL86-C1315Y ^{cd}	RV-HG mit AS-Sub. an Position 1315: Cystein zu Tyrosin	/
RV-HG-UL86-C1315Y-Rev. ^{cd}	RV-HG mit AS-Sub. an Position 1315: Tyrosin zu Cystein	/

^aAS-Sub.: Aminosäuresubstitution

^bRev.: Revertante

^cRekonstituiert aus: Vgl. Tab. 11

^dMittels *En-passant*-Mutagenese generierte Virusstämme

B.1.2 Nukleinsäuren

B.1.2.1 Primer

Tab. 6: Primer und Sonden für die *Real-Time-PCR*

Primer	Primersequenz
5' CMV-TM	AAGCGGCCTCTGATAACCAAG
3' CMV-TM	GAGCAGACTCTCAGAGGATCGG
CMV-Probe ^a	CATGCAGATCTCCTCAATGCGGCG
5' CMV-ST	TCTCAGCCACCATTACTGAGGACAGAGGGA
3' CMV-ST	GGTCACTAGTGACGCTTGTATGATGACCA
FW IL8	TCACTGTGTGTAACATGACTTCCA
RW IL8	TTCACACAGAGCTGCAGAAATCA
IL8-Probe ^a	CTGGCCGTGGCTCTCTTGGCAG

^aFluorescein (FAM) - Rhodamin (TAMRA) gekoppelt

Tab. 7: Primer für die Sequenzanalyse 1

Primer	Primersequenz
5' CMV IE 73	GACGTCAATGGGTGGAGTATTT
5' CMV IE 381	AGTACATCAATGGGCGTGGA
5' pcDNA3.1MCS	GGTCTATATAAGCAGAGCTC
3' pcDNA3.1MCS	CAGACAATGCGATGCAATTT
5' UL86 ORF	GTAGAAAACGCCACACTGGC
3' UL86 ORF	GGTTATTTTTTGACCAGCGGC
5' UL86 189	GGTTATTTTTTGACCAGCGGC
5' UL86 762	CTAGACAACCCACCACGTA
5' UL86 990	TCATCTGACTTCGGGCCAAC
5' UL86 1568	GGTGGGCAACATCACGCTCT
5' UL86 1964	GTTGATCGCCGAACACCTGG
5' UL86 2166	CTGCCGCGTAACATGGAAGG
5' UL86 2559	GACGCACATACCCGCTGCT
5' UL86 2996	CAACGTGTTGCACTCAGTCAT
5' UL86 3375	GAGGTGGACCGCTGGATCCG
5' UL86 3531	GCCGGTGACGATGGACGTTA
5' UL86 3802	ACAGAAGAGATTATCGCGGC
3' UL86 4044	TTCGGACGTAGCAAAAGCCC
3' UL86 4070	CCTACGACGTAGTTACCAA
5' UL46 ORF	GGTCACGTCCTGGGCATCCA
3' UL46 ORF	GATGTGCGGGCACCGAGGAC
5' UL46 198	TGCTCATCCGCATGGAGACG
3' UL46 839	CTAAAGTTGTCCAAACGGAC
5' UL48a ORF	TAAACAGACCGCCTGCCACG
3' UL48a ORF	CCGAGATGAACCTGTGGCCG
5' UL48a 48 Bp. v. ATG	CGGCGTTTAGCAGCGGCTT
5' UL85 ORF	TCACCTAGACGCAAACGCGG
3' UL85 ORF	GTACTIONGCGACGCCATCAT
5' UL85 213	TTGATGCGGCGCGTAGAAGG
3' UL85 788	TCGTCGGGCGACACGTGCTG

Tab. 8: Primer für die Sequenzanalyse 2

Primer	Primersequenz
5' UL77 ORF	TGGCGGTCAAGTCTGGAGCGTA
3' UL77 ORF	ACGGGCCCATGTGTTTGAAA
5' UL77 1	ACTATCTGGGACGGCGTCAG
5' UL77 277	AGTGCAGACTCGACGAAGGA
5' UL77 575	TTTTCGCGGCGAGGTGGTCAAC
5' UL77 883	TGACGGCGGTGTTGAGTGAG
5' UL77 1184	CGACGTGCTTTCTCTCTGGA
5' UL77 1485	GTACAGTACTACATCGGGCC
5' UL77 1783	TGTTGTCAGTGACCCTGCCG
5' UL56 ORF	AAACCGCAGCACCCAGACAG
3' UL56 ORF	AGCGGCCCGCAGTTATTTG
5' UL56 582	CTACGAGGAGCTGACCATCA
5' UL56 881	TGTCGGATTTTACCTACTGGTC
5' UL56 1181	GCAACGAGATGTACACCAAATC
5' UL56 1486	CACGAGGCTCTCGACTTGGT
5' UL56 1785	TGTGGTCAATAACCTGATCCA
5' UL56 2081	AGATGTGGATGCACGTGCGG
5' UL56 2369	TCTCGGGTGTCTTCAGGGAG
3' UL56 1891	CATTGTGAGAGAGGGGATAACGATC
3' UL56 2100	GACGGAGAGCACGAGCTCC
5' UL89 Exon 1 ORF	TCGCCACGGTTTGTGGCAAG
3' UL89-Exon 1 ORF	CCATCATGTTGCGCGGAGAC
3' UL89 Exon 1 476	CGTGTATCAATAAATCTTT
5' UL89 Exon 2 ORF	TGCCTAGCTGACCCTGAAAC
3' UL89 Exon 2 ORF	CCAGTCGAGCGTGCGTAATC
3' UL89 Exon 2 1671	TAGAAGAGCACGCGGATGAG
5' UL104 ORF	AGACGCGGTAGATGGTCTTGACCT
3' UL104 ORF	TTTCCTCAAAGAGCAGGTAGAGCG
5' UL104 62	TGACCTTGTGACGATCCGT
5' UL104 362	ACGCGGCGTTGTTCCCTAC
5' UL104 656	ACCTGCTGCAGGCTAACCTG
5' UL104 947	TGAAAGTGGTGACCGCCAGC
5' UL104 1263	GGCGCCCGAGCGGGACATCC
5' UL104 1576	AGCTTCTTCTCGCAGTTCGT
5' UL104 1863	GATTTGCAGCCGCGAGAAGG
5' UL80a/UL80.5 ORF	ATCTGTAATATTAGATGATTGGCGC
3' UL80a/UL80.5 ORF	GCATCTAGAGAGAGACTTCTTTGTT
5' UL80 282	GGAGATTGTACGCCGCGCTT
5' UL80 567	TGACGGGCTACGTGCACAGT
5' UL80 879	GTCCCCGTCGCCTCCAGTCG
5' UL80 1167/UL80.5 161	AGTGCCCGTCATGTATCCCG
5' UL80 1486/UL80.5 480	TCGCAGAAGCAGCACCGTCA
5' UL80 1779/UL80.5 773	TCTTCCCTCTGCGGCCTCTT
5' UL80 2080/UL80.5 1074	GATCTGAATCGGCGGATTTT
5' pEP-KanS 825	AATATGGCTCATAACACCCC
5' pEP-KanS 700	TTCCCATACAATCGATAGAT
3' pEP-KanS 150	CAGACCGATACCAGGATCTT
3' pEP-KanS 227	TGATTTCTCACTTGATAACC

Tab. 9: Primer für die *En-passant*-Mutagenese

Das die Aminosäuresubstitution induzierende Nukleotid ist jeweils unterstrichen und fett unterlegt.

Primer	Primersequenz
UL56 L241P FW	CAGTCCGATGTGAATATCCAGACGGTGGAGCAGGACCTGC <u>CGG</u> ACCTGACAA CGCGCATCAGGATGACGACGATAAGTAGGG
UL56 L241P RV	AGGACTCCAGCCAAGTGGGGGATGCGCGTTGTCAGGTCC <u>G</u> GCAGGTCCTGC TCCACCGTCCAACCAATTAACCAATTCTGATTAG
UL56 C325Y FW	GGCATCACCATCCAGCAGCTAAATGTGTATCACCAGCTGT <u>A</u> CCGGGCGCTCAT GAACGGCAGGATGACGACGATAAGTAGGG
UL56 C325Y RV	CCGTACAGATGGCGACTGATGCCGTTTCATGAGCGCCCGG <u>T</u> ACAGCTGGTGAT ACACATTTCAACCAATTAACCAATTCTGATTAG
UL56 R369S FW	GAGCGCATGTTTCGTGGGGTCGGTCTTTGCCGCCCCCAACAG <u>C</u> ATCATCGACC TCATCACATCAGGATGACGACGATAAGTAGGG
UL56 R369S RV	CGAAAGCTTGAATGCTGAGGGATGTGATGAGGTCGATGAT <u>G</u> CTGTTGGGGGC GGCAAAGACAACCAATTAACCAATTCTGATTAG
UL86 A436D FW	CGTTGCCACCACGGCCTACCTGCTAAACCGGGACCGT <u>G</u> ACGTACAAAAAATA GACTTTGAGGATGACGACGATAAGTAGGG
UL86 A436D RV	CAGCGTCTTGAGCGCGTCCACAAAGTCTATTTTTTGTACG <u>T</u> CACGGTCCCGGT TTAGCAGCAACCAATTAACCAATTCTGATTAG
UL86 G525D FW	ATGAAGCAGGACTTTGTGGTCACCGACTTCTACAAGGTGG <u>A</u> CAACATCACGCT CTACACCGAGGATGACGACGATAAGTAGGG
UL86 G252D RV	GTCGAAGAAGGGGTGCAGCTCGGTGTAGAGCGTGATGTTG <u>T</u> CCACCTGTAG AAGTCGGTCAACCAATTAACCAATTCTGATTAG
UL86 R583L FW	CCTTCCACGAACTGCGCACCTGGGAGATCATGGAACACATGCT <u>I</u> ACTGCGGCC ACCACCCGACAGGATGACGACGATAAGTAGGG
UL86 R583L RV	AAAGTCGCAACGTCTCTTCGTAGTCGGGTGGTGGCCGCAGT <u>A</u> GCATGTGTTT CATGATCTCCCAACCAATTAACCAATTCTGATTAG
UL86 R583L FW Rev. ^a	CCTTCCACGAACTGCGCACCTGGGAGATCATGGAACACATGCG <u>G</u> ACTGCGGCC ACCACCCGACAGGATGACGACGATAAGTAGGG
UL86 R583L RV Rev.	AAAGTCGCAACGTCTCTTCGTAGTCGGGTGGTGGCCGCAGT <u>C</u> GCATGTGTTT CATGATCTCCCAACCAATTAACCAATTCTGATTAG
UL86 F1225L FW	AAGGCCATCTACGACCATCGCGAAGCGGACGCACAGACTTT <u>A</u> GCGGCCACAC ACAACCCCTGAGGATGACGACGATAAGTAGGG
UL86 F1225L RV	GACAGCCGGCTTGCGAGGCCAGGGGTTGTGTGTGGCCGCT <u>T</u> AAAGTCTGTG CGTCCGCTTCAACCAATTAACCAATTCTGATTAG
UL86 C1315Y FW	CGTCTGCGTCAAGGCACGGAACAACCTCATCGAAAACCCGT <u>A</u> CCGTCTGACG CAGGAAGCGCAGGATGACGACGATAAGTAGGG
UL86 C1315Y RV	GGTGGTGCTGAGGATCGGTAGCGCTTCTGCGTCAGACGGT <u>I</u> ACGGGTTTTTCG ATGAGTTGCAACCAATTAACCAATTCTGATTAG
UL86 C1315Y FW Rev.	CGTCTGCGTCAAGGCACGGAACAACCTCATCGAAAACCCGT <u>G</u> CCGTCTGACG CAGGAAGCGCAGGATGACGACGATAAGTAGGG
UL86 C1315Y RV Rev.	GGTGGTGCTGAGGATCGGTAGCGCTTCTGCGTCAGACGG <u>C</u> ACGGGTTTTTCG ATGAGTTGCAACCAATTAACCAATTCTGATTAG

^aRev.: Revertante

Tab. 10: Primer für Klonierungen

Die Restriktionsschnittstellen sind jeweils unterstrichen.

Primer	Primersequenz
5' UL86 <i>Eco</i> R I <i>Sbf</i> I	ATCGGAATTCGT <u>CCT</u> GCAGGATGGAGAACTGGTCGGCGCTCGAGC
3' UL86 <i>Pac</i> I <i>Not</i> I	ATATGCGGCCGCTTTTTAATTAATCACGAGTTAATAACATGGATTGC
5' UL80 <i>Eco</i> R I	ATGACGAATTCATGACGATGGACGAGCAGCA
3' UL80 <i>Not</i> I	ATCATAGCGGCCGCTTACTCGAGCTTATTGAGCG
5' UL80a <i>Eco</i> R I	ATGACGAATTCATGTCGCACCCTCTGAGTGC
3' UL80a <i>Not</i> I	AATCAAGCGGCCGCTTACTCGAGCTTATTGAGCG
3' UL80/UL80a Flag <i>Not</i> I	CTCGAGCGGCCGCTCATTATCGTCATCGTCTTTGTAGTCCCCGGGCT

B.1.2.2 Bacmide und Plasmide

Tab. 11: Erhaltene und generierte Bacmide

Bacmid	Eigenschaft
pHG ^a	In die <i>unique short</i> Region des für HCMV-AD169 kodierenden Bacmids HB5 wurde eine <i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i> (EGFP) exprimierende, unter der Kontrolle des <i>Major Immediate Early</i> Promotors (MIEP) stehende Expressionskassette stabil integriert (Borst et al., 2000)
pHG-UL56-L241P ^c	pHG mit AS-Sub ^b . an Position 241: Leucin zu Prolin
pHG-UL56-C325Y ^c	pHG mit AS-Sub. an Position 325: Cystein zu Tyrosin
pHG-UL56-R369S ^c	pHG mit AS-Sub. an Position 369: Arginin zu Serin
pHG-UL86-A436D ^c	pHG mit AS-Sub. an Position 436: Alanin zu Asparaginsäure
pHG-UL86-G525D ^c	pHG mit AS-Sub. an Position 525: Glycin zu Asparaginsäure
pHG-UL86-R583L ^c	pHG mit AS-Sub. an Position 583: Arginin zu Leucin
pHG-UL86-R583L-Rev. ^{cd}	pHG mit AS-Sub. an Position 583: Leucin zu Arginin
pHG-UL86-F1225L ^c	pHG mit AS-Sub. an Position 1225: Phenylalanin zu Leucin
pHG-UL86-C1315Y ^c	pHG mit AS-Sub. an Position 1315: Cystein zu Tyrosin
pHG-UL86-C1315Y-Rev. ^c	pHG mit AS-Sub. an Position 1315: Tyrosin zu Cystein

^apHG wurde freundlicherweise von Eva Borst und Martin Messerle, Medizinische Hochschule Hannover, zur Verfügung gestellt.

^bAS-Sub.: Aminosäuresubstitution

^cErzeugt durch *En-passant*-Mutagenese (Tischer et al., 2006)

^dRev.: Revertante

Tab. 12: Zur Verfügung gestellte Plasmide

Plasmid	Ursprung/Eigenschaft	Art.-Nr.
pcDNA3.1(+)	Eukaryotischer Expressionsvektor	Invitrogen: V790-20
pEPkan-S	Transferplasmid für die Insertion des Kanamycin-Resistenzgens mittels <i>En-passant</i> -Mutagenese (Tischer et al., 2006)	/
pCBpp71 ^a	Der eukaryotische Expressionsvektor pCBpp71 enthält den Leserahmen des HCMV Proteins pp71 unter der Kontrolle des HCMV-Enhancer/Promoters	/

^apCBpp71 wurde freundlicherweise von Thomas Stamminger, Institut für Klinische und Molekulare Virologie, Universitäts-Klinikum Erlangen, zur Verfügung gestellt.

Tab. 13: Neu generierte Plasmide

Plasmid	Ursprung/Eigenschaft
pPLA-1	pcDNA3.1(+)-HCMV-UL86 (MCP)
pPLA-11	pcDNA3.1(+)-HCMV-UL80a - 3' Flag (pPR)
pPLA-13	pcDNA3.1(+)-HCMV-UL80.5 - 3' Flag (pAP)

B.1.3 Antivirale Substanzen

AIC246, AIC2, AIC3, Bay 38-4766 und BDCRB wurden in der Medizinisch Chemischen Abteilung der Bayer Pharma AG, Wuppertal synthetisiert und als 50 millimolar (mM) Stock in DMSO gelagert. Die intravenöse Formulierung von

Ganciclovir (Cymevene; Roche) wurde als 50 mM Stock in einer 0.9%igen Natriumchloridlösung gelagert.

B.1.4 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Puffer und Lösungen

Soweit nicht gesondert angegeben, wurden die verwendeten Chemikalien von den Firmen Invitrogen (Karlsruhe), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen. Alle Lösungen wurden mit hochreinem TKA-Wasser (Thermo Fisher Scientific, Niederelbert) bereitet, daher wird im Text die Bezeichnung H₂O für TKA-Wasser verwendet.

PCR-Gefäße (0,2 Milliliter (ml)), Reaktionsgefäße (0,2 ml; 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml) und Filterspitzen wurden von der Firma Eppendorf (Hamburg) bezogen. Zellkulturflaschen, Lochplatten und Plastikröhrchen (Falcons) wurden von der Firma Becton-Dickinson (Heidelberg) erworben. Serologische Pipetten wurden von der Firma Corning (München), Elektroporationsküvetten von der Firma Biorad (München), Kryo-Einfrierröhrchen von der Firma Thermo Scientific (Karlsruhe) und Zellschaber von der Firma TPP (Trasadingen, Schweiz) bezogen.

Tab. 14: Materialien für die eukaryotische Zellkultur

Artikel	Hersteller	Art.-Nr.
DMEM	Invitrogen	21063-029
DPBS ohne CaCl ₂ /MgCl ₂	PAN Biotech	04-36500
Fötale Kälber Serum (FKS)	Biochrom	50115
FuGENE® HD Transfection Reagent 0,4 ml	Roche	4709691001
L-Glutamine 200 mM	PAN Biotech	P04-800100
MEM Eagle	Sigma Aldrich	M2279-500ML
MEM NEAA (100x) ohne L-Glutamin	PAN Biotech	P08-32100
MycAlert® Mycoplasma Detection Kit	Lonza	LT07-218
Opti-MEM	Invitrogen	31985-062
PenStrep (10.000 U Penicillin, Streptomycin 10 mg/ml)	PAN Biotech	P06-07100
Plasmocin	InVivo	ant-mpt
Sodium Bicarbonat 7.5%	Invitrogen	P04-44100
Sodium pyruvate 100 mM	PAN Biotech	P04-43100
SuperFect Transfection Reagent	Qiagen	301305
Trypanblau 0,4%	Gibco	15250-061
Trypsin 0,05%/ EDTA	PAN Biotech	P10-0231SP

Tab. 15: Materialien für die *En-passant*-Mutagenese, Klonierungen, Gelelektrophorese und Real-Time-PCR

Artikel	Hersteller	Art.-Nr.
1 Kb Plus DNA-Ladder	Invitrogen	10787026
Ampicillin	Böhringer Mannheim	835269
Antarctic Phosphatase	NEB	M0289L
L-Arabinose	Sigma-Aldrich	A3256
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich	C1919
Difco™ LB Agar, Miller	Becton, Dickinson	244520
Ethidiumbromidlösung 1%	Roth	2218.2
Expand High Fidelity PCR System	Roche	11732650001
GelPilot DNA Loading Dye, 5x	Qiagen	239901
Gene Pulser Cuvettes 0.2 cm gap	Biorad	165-2086
Glycerol	Invitrogen	15514011
HiMark™ Pre-stained HMW	Invitrogen	LC5699
Kanamycin	AppliChem	A14930025
LB Agar	Sigma-Aldrich	L2897
LE Agarose	Biozym	840004
Novex Sharp Protein Standard	Invitrogen	LC5800
NucleoBond Xtra Midi	Machery Nagel	740410.10
NuPAGE Antioxidant	Invitrogen	NP0005
NuPAGE® MES SDS Running Buffer	Invitrogen	NP0002
NuPAGE® Novex 10% Bis-Tris Midi Gel	Invitrogen	WG1402BOX
PCR Nucleotid Mix	Roche	11814362001
Platinum® Taq DNA Polymerase	Invitrogen	10966-034
Platinum® Pfx DNA Polymerase	Invitrogen	11708-021
Plasmid Maxi Kit	Qiagen	12165
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen	28706
QuickLyse Miniprep Kit	Qiagen	27406
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen	Qiagen
TaqMan® Universal Master Mix	Applied Biosystems	430571
UltraPure™ 10X TAE Buffer	Invitrogen	15558-026

Tab. 16: Material für die Immunoblot- und Immunfluoreszenzanalyse

Artikel	Hersteller	Art.-Nr.
CohnII (humane IgG-Fraktion)	Sigma-Aldrich	G2388-10G
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche	4693124001
DPBS unsteril 2,5 L	Pan Biotech	P04-362500
Immersionsöl für die Mikroskopie	Neolab	44.950.100
ECL detection kit	GE	RPN2106
ECL Plus	GE	RPN2132
Magermilchpulver	Humana Milchunion	84355520007
PBS pH 7,4 (10x)	Invitrogen	70011-051
Protran 0.2µm Blotting Membran	Whatman	10 401 39
Ripa Buffer	Sigma-Aldrich	R0278-50ML
Roti-Free Stripping Buffer	Roth	0083.1
Triton X-100	Sigma-Aldrich	T-9284
Tween 20	Biorad	170-6531
Vectashield HardSet Mounting Medium with Dapi	Biozol	VEC-H-1500

Tab. 17: Material für die Isolierung von viraler DNA

Artikel	Hersteller	Art.-Nr.
Benzonase Nuclease, Purity >90%	Merck	70746-3
DNaseI 20.000 Units	Invitrogen	18047-019
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen	69506
DNeasy Tissue 96 Kit	Qiagen	69582
Nucleobond CB20	Machery-Nagel	740507
Poly(dA)-Poly(dT) Double Strand Duplexes	Amersham	27-7860

Tab. 18: Erstellte Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Blocklösung	2,5% FCS in PBS
Permeabilisierungspuffer	0,2% Triton X-100 in PBS
Puffer für die Paraformaldehyd Fixierung	50 ml 2 x PBS pH 7,4; ad 4 g Paraformaldehyd (4%) in 50 ml H ₂ O
1 x Transferpuffer	200 mM Glycerin, 25 mM Tris-Base, 20% Ethanol,
Waschpuffer	1 L 10 x PBS pH 7,4; 10 ml Tween-20 (0,1%); ad 9 L H ₂ O
Blocklösung	100 ml Waschpuffer, 5 g Magermilchpulver (5%),
6 x Probenpuffer für DNA	30% Glycerin; 0,025% Bromphenolblau; 0,025% Xylencyanol
6 x SDS Probenpuffer	0,225 M Tris HCL pH 6,8; 50% Glycerin, 5% SDS, 0,25 M Dithiothreitol; 0,025% Bromphenolblau
Ripa-Lysepuffer	10 ml Ripa Buffer (Sigma-Aldrich), versehen mit Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail (Roche)

B.1.5 Antikörper

Tab. 19: Primäre Antikörper

Antikörper/ Epitop	Name	Herkunft	Verdünnung		Zur Verfügung gestellt von	Katalog- nummer	Hersteller
β-Aktin	AC-15	M ^a	WB ^b 1:10000	/	/	A1978	Sigma-Aldrich
Flag	Anti-Flag	R ^c	WB 1:1000	IF ^d 1:1000	/	F7425	Sigma-Aldrich
IE1	mAb 63-27	M	unverdünnt	unverdünnt	B. Britt ^e	/	/
IE2	anti-pHM178	R	WB 1:5000	IF 1: 2500	T. Stamminger ^f	/	/
MCP	mAb 28-4	M	unverdünnt	unverdünnt	T. Stamminger	/	/
pp65	mAb 65-33	M	unverdünnt	unverdünnt	B. Britt	/	/
SCP	mAb11.2.23	M	WB 1:250	IF 1: 500	M. Mach ^f	/	/
UL69	mAK 69-66	M	unverdünnt	unverdünnt	T. Stamminger	/	/
UL84	anti-UL84	R	WB 1:1000	IF 1: 500	T. Stamminger	/	/
UL44	CMV UL44	M	WB 1:1000	IF 1: 200	/	sc-69744	SantaCruz

^aM: Maus

^bWB: Western Blot

^cK: Kaninchen

^dIF: Immunfluoreszenz

^eDepartment of Pediatrics, University of Alabama

^fInstitut für Klinische und Molekulare Virologie, Universitäts-Klinikum Erlangen

Tab. 20: Sekundäre Antikörper

Antikörper/ Epitop	Kopplung	Herkunft	Verdünnung	Verwendung	Katalog- nummer	Hersteller
α-Maus	POD ^a	Z ^b	1:10000	WB ^c	115-035-003	Dianova
α-Kaninchen	POD	Z	1:10000	WB	111-035-003	Dianova
α-Maus	Alexa 488	Z	1:400	IF ^d	A-11029	Invitrogen
α-Maus	Alexa 555	Z	1:400	IF	A-21424	Invitrogen
α-Kaninchen	Alexa 555	Z	1:400	IF	A-11034	Invitrogen

^aPOD: Peroxidase

^bZ: Ziege

^cWB: Western Blot

^dIF: Immunfluoreszenz

B.1.6 Restriktionsenzyme

Alle in dieser Dissertation verwendeten Restriktionsenzyme wurden von der Firma New England Biolabs (NEB, Frankfurt) bezogen und nach Angaben des Herstellers verwendet.

B.1.7 Computer-Programme

Die im Rahmen der Dissertation erzeugten Grafiken, Abbildungen und Texte wurden mit Word, Excel, Powerpoint (Microsoft), Corel Draw12 (Corel Corporation), Paint Net (<http://www.getpaint.net>), GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc.) und Spot Advanced (Visitron Systems) generiert. Alignments wurden mittels der online verfügbaren Software MAFFT (*Multiple Alignment using Fast Fourier Transform*, www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft) generiert (151). Sekundärstrukturen wurden mit Hilfe des *Protein Structure Prediction Server* (PSIPRED, <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>) analysiert (196). Weitere Strukturanalysen sowie komparatives Strukturmodellierung wurden mit Hilfe von UCSF Chimera (Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco) durchgeführt (103, 233). Sequenzanalysen wurden mit Hilfe von Vector NTI (VNTI; Invitrogen, Karlsruhe) und Tablet (<http://bioinf.scri.ac.uk/tablet>) (187, 209) durchgeführt.

B.1.8 Geräte

Tab. 21: Verwendete Geräte

Artikel	Hersteller
-80°Schrank MDF-U73V	Sanyo, Bad Nenndorf
-150°C Truhe MDF-C21546VAN	Sanyo, Bad Nenndorf
Absaugpumpe BVC 01	Vaccubrand, Wertheim
Analysewaage AT250	Mettler, Giessen
Autoklav Tecnoclav	Integra Bioscience, Fernwald
Bakterieninkubator Minitron HT	Infors, Bottmingen
CCD-Kamera E.A.S.Y 429K	Herolab, Wiesloch
CCD-Kamera Spot Flex	Visitron Systems, Puchheim
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Einschweißgerät Impulse Sealer TISH300	TEW, Tapei, Taiwan
Fotometer	Eppendorf, Hamburg
Gelkammer: Agarosegel Mini Sub-Cell GT	Biorad, München
Gelkammer: Agarosegel Sub-Cell GT	Biorad, München
Gelkammer: Agarosegel Wide Mini Sub-Cell GT	Biorad, München
Gelkammer: Polyacrylamidgel XCell 4 SureLock Midi-cell	Invitrogen, Karlsruhe
Gene Pulser Modell 165-2076	Biorad, München
Handdispenser Handystep Electronic	Brand, Wertheim
Heizblock Thermocycler comfort	Eppendorf, Hamburg
HERAcell CO2 Inkubator	Thermo Scientific, Karlsruhe
Magnetrührer Ikamag Rec-G	IKA, Staufen
Mikroskop: Fluoreszenzmikroskop Axio Observer. A1	Zeiss, Oberkochen
Mikroskop: Fluoreszenzmikroskop DMRB	Leica Mikrosysteme, Wetzlar
Mikroskop: Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen
Mikrowelle	Siemens, Erlangen
pH Meter Calimatic 766	Knick, Berlin
Pipettierhilfe Pipetboy	Integra, Fernwald
Plattformschüttler Duomax 1030	Heidolph, Schwabach
Präzisionswaage Kern 440-47n	Balingen-Frommern
Reinstwasseraufbereitung TKA-GenPure	Niederelbert
Sicherheitswerkbank HERA Safe	Thermo Scientific, Karlsruhe
Spannungsquelle Power Pac 300	Biorad, München
Stickstofftank	Cryotherm, Kirchen (Sieg)
Thermocycler Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler Mastercycler Personal	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler Taq-Man ABI Prism 7700	Applied Biosystems, Darmstadt
Transilluminator: Fluo Box	Bayer Technologies GmbH, Leverkusen
Transilluminator: Lumi Imager	Roche, Mannheim
Transilluminator: UVT-20L	Herolab, Wiesloch
Vortexer Vortex-Genie 2	VWR International, Darmstadt
Wasserbad GFL 10-13	GFL, Burgwedel
Zentrifuge Biofuge Pico	Thermo Scientific, Karlsruhe
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	Thermo Scientific, Karlsruhe
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Thermo Scientific, Karlsruhe
Zentrifuge 5417-R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Beckmann Avanti J-25	Beckmann Coulter, Krefeld
Zentrifuge Optima LK-90 (Ultrazentrifuge)	Beckmann Coulter, Krefeld

B.2 Methoden

B.2.1 Zellkultur

B.2.1.1 Kultivierung von Säugerzellen

Die verwendeten Säugerzellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit kultiviert. In regelmäßigen Abständen wurden sie auf Mycoplasmen (MycoAlert Lonza) getestet und gegebenenfalls behandelt (Plasmocin, InVivo) bzw. verworfen. Humane Cervix Carzinom Zellen (HeLa), normale humane Hautfibroblasten (*normal human dermal fibroblast*, NHDF) bzw. diploide humanen Lungenfibroblasten (MRC-5-Zellen) wurden entsprechend ihrer benötigten Menge in Kulturmedium kultiviert (vgl. Tab. 22).

Tab. 22: Kulturmedien für die verwendeten eukaryotischen Zelllinien

Zelllinie	Verwendetes Kulturmedium
HeLa	DMEM Eagle mit 10% FKS, 1% PenStrep und 1% L-Glutamin
MRC-5	MEM-Eagle mit 10% FKS, 2% Natrium Bicarbonat, 1% Natrium Pyruvat, 1% MEM NEAA, 1% PenStrep und 1% L-Glutamin
NHDF	MEM Eagle mit 10% FKS, 1% PenStrep und 1% L-Glutamin

Für das Passagieren wurden die Zellen mit PBS (*phosphat buffered saline*) gewaschen und mit Trypsinlösung von den Zellkulturflaschen gelöst. Die abgelösten Zellen wurden in frischem Kulturmedium resuspendiert und in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:10 in neue Zellkulturflaschen überführt.

B.2.1.2 Transfektion von HeLa-Zellen

Das Einbringen von Plasmid-DNA in HeLa-Zellen erfolgte mit FugeneHD (Roche) in einem Plasmid-DNA / FugeneHD-Verhältnis von 2:3 nach Angaben des Herstellers. Die transfizierten Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion analysiert.

B.2.1.3 Kryokonservierung

Bei einer Konfluenz von 80 – 90% wurden die Zellen von den Zellkulturflaschen mit Trypsinlösung abgelöst und bei 900 x g zentrifugiert (vgl. 2.1.1). Der Überstand wurde abgenommen, die Zellen in Einfriermedium (drei Teile RPMI, zwei Teile DMSO, 20% Glukose) resuspendiert und in Kryo-Einfrierröhrchen aliquotiert. Anschließend wurden die Kryo-Einfrierröhrchen in Kryo-Gefrierbehältern (VWR,

Darmstadt) auf -80°C abgekühlt. Die Zellen wurden bei -140°C bzw. in flüssigem Stickstoff gelagert.

B.2.2 Virologische Methoden

B.2.2.1 Experimentelle Infektionen

Für experimentelle Virusinfektionen wurden, soweit nicht anders angegeben, subkonfluente NHDF-Zellen mit einer Infektionsmultiplizität (*multiplicity of infection*, MOI) von 0,1 infiziert. Hierfür wurden mit PBS gewaschene Zellen mit in NHDF-Kulturmedium verdünntem Virusstock versehen. Zwei Stunden nach Infektion wurden die NHDF-Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit normalem bzw. mit entsprechend substanzversetztem NHDF-Kulturmedium inkubiert.

B.2.2.2 Virusrekonstitution aus Bacmid-DNA

$3,5 \times 10^5$ MRC-5-Zellen wurden in 6-Lochplatten ausgesät. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 ml MRC-5-Kulturmedium versehen. 1 Mikrogramm (μg) Bacmid-DNA wurde mit 1 μg pp71 Plasmid-DNA in 10 μl Superfect (Qiagen, Hilden) überführt, wonach der Ansatz auf 100 μl mit Opti-MEM aufgefüllt wurde. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurden dem Ansatz 200 μl Opti-MEM hinzugegeben und die Suspension tropfenweise auf die MRC-5-Zellen pipettiert. Nach vier Stunden wurde das Medium gewechselt. Die transfizierten Zellen wurden nach sieben Tagen in eine 25 Quadratcentimeter (cm^2) Zellkulturflasche überführt und bis zu dem Auftreten eines zytopathischen Effekts (ZPE) kultiviert.

B.2.2.3 Herstellung von Virusstocks

Für die Generierung von Virusstocks wurden subkonfluente NHDF-Zellen in 175 cm^2 Flaschen mit einer MOI von 0,1 infiziert. Bei einem ZPE von 80% wurde der Überstand abgenommen und bei $2000 \times \text{g}$ zentrifugiert. Mit dem daraus resultierenden Überstand wurden erneut subkonfluente NHDF-Zellen in 175 cm^2 Flaschen infiziert. Nach sechs bis acht Tagen und einem ZPE von 80 - 90% wurde der Überstand bei $2000 \times \text{g}$ zentrifugiert, abgenommen und aliquotiert in Kryoeinfrierröhrchen bei -80°C gelagert.

B.2.2.4 Virustitration

Die Anzahl an infektiösen Viruspartikeln wurde über eine Analyse der viralen IE1-Genexpression durch indirekte Immunfluoreszenz ermittelt (22, 184). Hierfür wurden subkonfluente NHDF-Zellen in 24-Lochplatten mit in 1:5-Verdünnungsschritten (200 μ l Virus in 800 μ l Kulturmedium) verdünntem Virusstock infiziert. Zwei Stunden nach Infektion wurden jeweils 500 μ l Kulturmedium hinzugegeben und der Ansatz für drei Tage inkubiert. Es folgte eine Fixierung und Permeabilisierung der Zellen mit eiskaltem Methanol. Nach Abnahme des Methanols wurden die Zellen getrocknet und in PBS rehydriert. Über eine indirekte Immunfluoreszenz unter Verwendung des anti-IE1 monoklonalen Antikörpers (*monoclonal antibody*, mAb) mAb 63-27 als Erstantikörper sowie mAb Alexa488 *goat α mouse* als Zweitantikörper wurde die Anzahl IE1-positiver Zellen am Immunfluoreszenzmikroskop bestimmt (vgl. Tab. 19 und 20). Virustitrationen wurden für jede Probe in Doppelbestimmung durchgeführt (7, 117, 178, 184).

B.2.2.5 Wachstumskurven

Für die Analyse des Wachstumsverhaltens rekombinanter Viren wurden NHDF-Zellen in 12-Lochplatten einen Tag vor der Infektion ausgesät. Die Infektion erfolgte nach Standardprotokoll (vgl. 2.2.1). Der Überstand wurde jeweils 2, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 und 192 Stunden nach Infektion in Kryo-Einfrierröhrchen überführt und bei -80°C gelagert. Nach Beendigung des Experiments wurden die Proben aufgetaut und titriert (vgl. 2.2.4). Die Replikationsanalyse wurde jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt.

B.2.2.6 Ermittlung der antiviralen Aktivität

EC_{50} - und EC_{90} -Werte wurden mit Hilfe von auf *enhanced green fluorescent protein* (EGFP)-Expression basierenden Fluoreszenz-Reduktions-Experimenten ermittelt. Für das Experiment wurden Virusstämme verwendet, bei denen im Genom eine EGFP-Expressionskassette stabil integriert vorliegt (34). Die Suszeptibilitäten der Virusstämme wurden in mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten jeweils in Doppelbestimmung ermittelt.

Hierfür wurden $1,5 \times 10^4$ NHDF-Zellen pro Loch in schwarze 96-Lochplatten mit klarem Boden ausgesät. Dabei wurde der Rand der Platte ausgelassen und nur mit NHDF-Kulturmedium belegt, um Randeffekte zu vermeiden. Am darauf folgenden

Tag erfolgte die Infektion mit RV-HG (MOI 0,2 - 0,5) bzw. den entsprechenden rekombinanten Viren (MOI 0,1 – 0,5). Zwei Stunden nach Infektion wurde das Virusinokulum abgenommen, wonach 200 µl NHDF-Kulturmedium in alle Vertiefungen bis auf Spalte drei gegeben wurde. Spalte drei wurde jeweils mit 300 µl einer definierten Substanzkonzentration befüllt. Diese wurde in einer 1/3 Verdünnungsreihe über die rechten Spalten verdünnt. Nach sieben Tagen Inkubation bei 37°C wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 50 µl PBS pro Vertiefung zugeführt. Die EGFP-Intensität wurde über eine *charge-coupled-device* - (CCD) Kamera, die 96 Einzelbilder simultan verarbeiten kann (FluoBox; Bayer), detektiert.

Substanzeffekte wurden als prozentualer Anteil der Fluoreszenzreduktion in Substanzanwesenheit im Vergleich zur Fluoreszenzintensität der unbehandelten Kontrolle berechnet. EC₅₀-Werte (Substanzkonzentrationen, die eine 50%ige EGFP-Reduktion bzw. einen halbmaximalen inhibitorischen Effekt induzieren), EC₉₀-Werte (Substanzkonzentrationen, die eine 90%ige EGFP-Reduktion bzw. einen 90%igen inhibitorischen Effekt induzieren) und Standardabweichungen wurden mit Excel und GraphPad Prism 4.4 ermittelt.

B.2.2.7 Time-of-addition-Kinetik

Um den Zeitpunkt des inhibitorischen Effekts der eingesetzten antiviralen Substanzen innerhalb des HCMV-Replikationszyklus zu bestimmen, wurden *Time-of-addition*-Experimente durchgeführt. Dabei wird die antivirale Substanz zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion zugeführt. $1,5 \times 10^4$ NHDF-Zellen wurden pro Loch in schwarze 96-Lochplatten mit klarem Boden ausgesät und am darauf folgenden Tag mit RV-HG MOI 0,1 infiziert. Zwei Stunden nach Infektion wurde das Virusinokulum entfernt und jeweils 200 µl NHDF-Kulturmedium zugeführt. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion (2, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 78, 96 und 120 Stunden) wurde den Zellen die in NHDF-Kulturmedium verdünnte antivirale Substanz ($10 \times EC_{50}$) zugeführt. 120 Stunden nach Infektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und im Anschluss mit 50 µl PBS pro Vertiefung versehen. Die EGFP-Intensität wurde, wie oben beschrieben, ermittelt (vgl. B.2.2.6). Substanzeffekte wurden jeweils als prozentuale Fluoreszenzreduktion im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ermittelt.

B.2.3 Molekularbiologische Methoden

Standardmethoden wie Restriktion von DNA, DNA-Reinigungen, Dephosphorylierungen, Ligationen, Agarosegelelektrophorese etc. wurden, soweit nicht anders aufgeführt, dem Laborhandbuch „Molecular Cloning: A Laboratory Manual“ entnommen bzw. nach Angaben der Hersteller der entsprechenden Kits durchgeführt (252).

B.2.3.1 Kultivierung und Selektion von Bakterien

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in Luria Bertani (LB) -Medium und auf LB-Agarplatten bei 37°C bzw. für *E. coli* GS1783 bei 32°C. Die Selektion von Transformanten erfolgte in LB-Medien bzw. auf LB-Agarplatten, die Ampicillin (AMP) (50 µg/ml), Chloramphenicol (CAM) (25 µg/ml), Kanamycin (KAN) (50 µg/ml) bzw. CAM/KAN als Selektionsmarker enthielten.

B.2.3.2 Erzeugung elektrokompetenter *E. coli* GS1783

Eine Einzelkolonie *E. coli* GS1783 wurde in 5 ml CAM-haltiges LB-Medium überführt und über Nacht (ü.N.) bei 32°C im Bakterieninkubator bei 180 Umdrehungen pro Minute (*rounds per minute*, rpm) kultiviert. 3 ml dieser Kultur wurden am darauf folgenden Tag in 150 ml CAM-haltiges LB-Medium (25 µg/ml CAM) überführt, bis zu einer OD₆₀₀ (optischen Dichte) von 0,5 – 0,6 bei 32°C und 180 rpm geschüttelt und im Anschluss für 20 Minuten (min) auf Eis inkubiert. Alle nachfolgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Bakteriensuspension wurde in ein Schraubdeckelgefäß (500 ml) überführt und 10 min bei 6000 rpm (J-21 Rotor, Beckmann Coulter) und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Bakterienpellet in 100 ml eiskalter, 10%iger Glycerinlösung resuspendiert und erneut 10 min bei 6000 rpm und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde noch zweimal in 10%iger Glycerinlösung resuspendiert und pelletiert. Zum Schluss wurde das Pellet in 1,5 ml 10%iger Glycerinlösung aufgenommen, zu je 50 µl in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert und diese in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Bakterien wurden bei -80°C gelagert oder direkt für eine Transformation verwendet.

B.2.3.3 Erzeugung rekombinations- und elektrokompetenter *E. coli* GS1783

Rekombinations- und elektrokompetente *E. coli* GS1783 wurden nach dem oben genannten Protokoll erzeugt (vgl. B.2.3.2). Abweichend davon wurde die

Bakteriensuspension bei einer OD_{600} von 0,5 für 15 min bei 42°C in einem Wasserschüttelbad inkubiert. Die Inkubation bei 42°C induziert die Expression der Rekombinasen des Red-Rekombinationssystems. Anschließend erfolgte eine 20-minütige Inkubation auf Eis. Die Bakteriensuspension wurde anschließend wie oben beschrieben pelletiert, in 10%iger Glycerinlösung resuspendiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren (vgl. B.2.3.2).

B.2.3.4 *En-passant*-Mutagenese (Bac-Mutagenese)

Im Rahmen der Dissertation sollten definierte Punktmutationen in das für das HCMV-Wildtypgenom kodierende Bacmid pHG inseriert werden (vgl. Tab. 11). Hierfür wurde das Verfahren der *En-passant*-Mutagenese im Rahmen der Dissertation etabliert. Die *En-passant*-Mutagenese basiert auf dem λ -Phage-Red-Rekombinationssystem (vgl. A. 4.1). Sie ermöglicht die markerlose Insertion oder Deletion von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe (308, 342). Zu Beginn wird eine Rekombinationskassette generiert, welche die gewünschte Mutation, einen positiven Selektionsmarker (hier Kanamycin) sowie eine I-Sce I-Schnittstelle aufweist. Zusätzlich beinhaltet die Rekombinationskassette beidseitig einen 60 basenpaar (bp) großen und bis auf die Punktmutation zur Zielsequenz homologen Sequenzabschnitt. Im ersten Rekombinationsschritt wird die Rekombinationskassette mit Hilfe der Red-Rekombinasen über homologe Rekombination basengenau in das Bacmid integriert (vgl. Abb. 14 und A. 4.1).

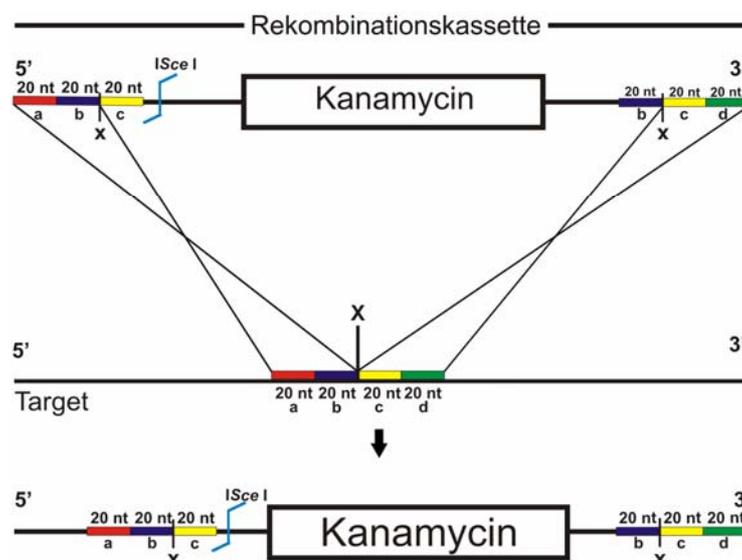


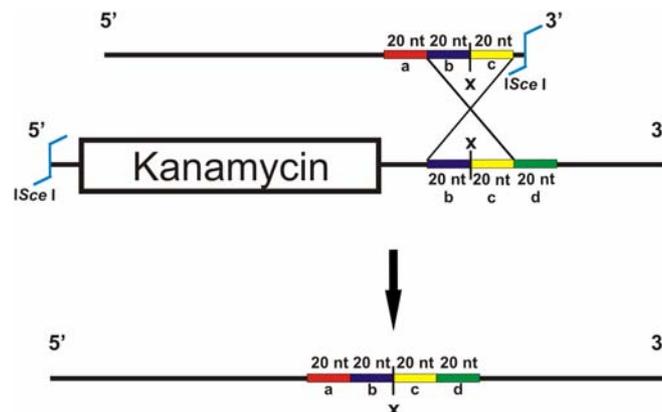
Abb. 14: Schematische Darstellung der Insertion des Selektionsmarkers während der ersten Red-Rekombination

Abb. 14: Fortgesetzt

Der komplementäre Bereich der Rekombinationskassette wird über homologe Rekombination basengenau in die Zielsequenz inseriert. Die zu inserierende Punktmutation ist mit einem x gekennzeichnet. Die komplementären jeweils 20 Basenpaar (bp) großen Sequenzabschnitte sind entsprechend rot (a), blau (b), gelb (c) und grün (d) dargestellt. Verändert nach (308)

Dabei findet eine Verdoppelung des 5' und 3' an die Punktmutation angrenzenden 40 bp großen Sequenzbereiches statt (vgl. Abb. 14, blau (b) und gelb (c) dargestellt).

Während der zweiten Red-Rekombination wird mit Hilfe eines arabinose-induzierbaren Promotors die Genexpression der Homingendonuklease I-Sce I initiiert (vgl. Abb. 15). I-Sce I schneidet innerhalb der Rekombinationskassette *in vivo* (vgl. Abb. 14 und 15). Der Doppelstrangbruch ermöglicht den durch hitzeschock-induzierten Red-Rekombinasen eine homologe Rekombination des doppelt vorliegenden 40 bp großen Sequenzabschnitts und führt zum Verlust der Selektionsmarkers (307, 308).

**Abb. 15: Schematische Darstellung der zweiten Red-Rekombination**

Die zu inserierende Punktmutation ist mit einem x gekennzeichnet. Die komplementären jeweils 20 Basenpaar (bp) großen Sequenzabschnitte sind entsprechend rot (a), blau (b), gelb (c) und grün (d) dargestellt. Verändert nach (308)

B.2.3.4.1 Design der Mutageneseprimer und Amplifizierung der Rekombinationskassette

Voraussetzung für eine erfolgreich verlaufende *En-passant*-Mutagenese ist das Design der jeweiligen Mutageneseprimer (vgl. Abb. 16). Diese werden so konstruiert, dass sie neben der entsprechenden Punktmutation sowie den angrenzenden homologen Sequenzen (60 bp) auch eine Amplifizierung der Rekombinationskassette aus dem Plasmid pEPkan-S ermöglichen (vgl. Abb. 16) (308). Der an die

Punktmutation (x) angrenzende Sequenzbereich wird in 20 Basenpaare (bp) große Fragmente (a, b, c und d) unterteilt (vgl. Abb. 16). Fragmente b und c grenzen dabei beidseitig an die Punktmutation. Der Vorwärtsprimer besteht vom 5' Ende her aus der Sequenz a - c sowie aus der mit der Rekombinationskassette hybridisierenden Sequenz. Der Rückwärtsprimer besteht vom 5' Ende her aus der reversen komplementären Sequenz von d - b sowie der Hybridisierungssequenz der Rekombinationskassette (vgl. Abb. 16).

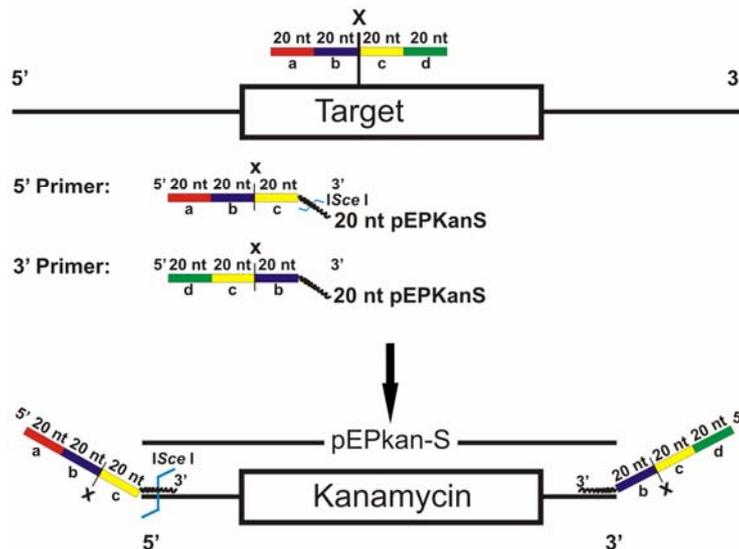


Abb. 16: Schematische Abbildung der Primergenerierung für die Insertion von Punktmutationen

Die zu inserierende Punktmutation ist mit einem x gekennzeichnet. Die komplementären jeweils 20 Basenpaar (bp) großen Sequenzabschnitte sind entsprechend rot (a), blau (b), gelb (c) und grün (d) dargestellt. Verändert nach (308)

Die Amplifizierung der Rekombinationskassette wurde mit der sogenannten *Touch-Down-PCR* durchgeführt. Dabei erhöht ein Temperaturdekrement von höheren zu niedrigeren Temperaturen die Spezifität der PCR-Amplifikation (vgl. Tab. 23).

Tab. 23: Zyklenabfolge der *Touch-Down-PCR*

<i>Touch-Down-PCR</i> Programm		
1. Initiale Denaturierung	95°C	5 min ^a
2. Denaturierung	95°C	20 sek ^b
3. Annealing	62°C	30 sek
4. Elongation	72°C	2 min
Temperaturdekrement	- 1°C	
Anzahl der Zyklen	17	
5. Denaturierung	95°C	30 sek
6. Annealing	45°C	30 sek
7. Elongation	72°C	2 min
Anzahl der Zyklen	18	
8. Finale Elongation	72°C	5 min
9. Abkühlung	4°C	ü.N. ^c

^amin: Minute^bsek: Sekunde^cü.N.: Über Nacht

Das Amplikon wurde über eine präparative Gelelektrophorese von PCR-Nebenprodukten getrennt über das „*QIAQuick Gel Extraction Kit*“ (QIAGEN, Hilden) gereinigt und in 100 µl H₂O eluiert.

B.2.3.4.2 Elektroporation der Rekombinationskassette in *E. coli* GS1783 und erste Red-Rekombination

100 Nanogramm (ng) des gereinigten linearen PCR-Amplifikats wurden in das Bacmid beinhaltende, rekombinations- und elektrokompetente *E. coli* GS1783 bei 200 Ohm und einer Kapazität von 25 Mikrofarad (µF) elektroporiert. Neben dem Chloramphenicol-Resistenzgen kodieren die Rekombinanten der ersten Rekombination zusätzlich für das Kanamycin-Resistenzgen. Daher wurden zur Selektion der Rekombinanten der ersten Rekombination die Ansätze auf CAM/KAN-haltige LB-Agarplatten plattiert. Die Inkubation der Ansätze erfolgte für anderthalb Tage bei 32°C, um eine Aktivierung des temperatursensitiven Red-Expressionssystems zu verhindern. Die Rekombinanten der ersten homologen Rekombination wurden anschließend mit Hilfe einer Kolonie-PCR sowie einer Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse (RFLP-Analyse) charakterisiert.

B.2.3.4.3 Zweite Red-Rekombination - Elimination der Rekombinationskassette

Die für die zweite Rekombination bestimmten Klone wurden ü.N. in 2 ml CAM/KAN-haltiges LB-Medium angeimpft. 100 µl dieser Kultur wurden am nächsten Tag in 2 ml CAM-haltiges LB-Medium überführt und für zwei Stunden bei 32°C inkubiert. Für die Induktion der I-Sce I-Expression erfolgte die Zugabe von 2 ml CAM-haltigem LB-Medium mit einer 1%igen L-Arabinosekonzentration. Nach 30 min bei 32°C wurde der Ansatz in ein auf 42°C erwärmtes Wasserbad für 15 min überführt. Die Temperaturerhöhung auf 42°C aktiviert den temperatursensitiven Promotor und damit die Expression der Red-Rekombinasen. Es folgte eine Inkubation für zwei Stunden bei 32°C. Der Bakterienansatz wurde in mehrfacher Verdünnung auf CAM/L-Arabinose-haltige LB-Agarplatten ausgestrichen und für anderthalb Tage bei 32°C inkubiert. Die Klone der zweiten Rekombination wurden über Kolonie-PCR und RFLPs auf den Verlust der Rekombinationskassette hin überprüft. Zusätzlich wurden die finalen Klone, die für die Virusrekonstitution verwendet wurden, über Sequenzierung (GATC Biotech, Konstanz) verifiziert. Von den Rekombinanten wurden jeweils zwei unabhängig voneinander generierte Klone mit verifizierter Sequenz als Glycerinstock angelegt und bei -80°C gelagert.

B 2.3.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten für Klonierungen bzw. Sequenzierungen wurde mit der Platinum *Pfx* DNA-Polymerase (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die PCR-Amplifikation wurde das nachfolgende Standard PCR-Programm verwendet (vgl. Tab 24).

Tab. 24: Zyklenabfolge der Standard-PCR

Standard-PCR Programm		
1. Initiale Denaturierung	95°C	5 min ^a
2. Denaturierung	95°C	30 sek ^b
3. Annealing	variabel °C	30 sek
4. Elongation	72°C	pro kb ^c 1 min
Anzahl der Zyklen	30	
5. Finale Elongation	72°C	5 min
6. Abkühlung	4°C	

^amin: Minute

^bsek: Sekunde

^ckb: Kilobasen

Die Zeit der Hybridisierung zwischen Primer und Matrize (Schritt 3) bzw. die Zeit der Elongation (Schritt 4) wurde je nach T_m -Wert der Primer bzw. der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments variiert (vgl. Tab. 24).

B 2.3.5.1 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR gewährleistet eine Überprüfung der Insertion bzw. Deletion der Rekombinationskassette nach erster und zweiter Red-Rekombination. Dabei gibt die Länge des PCR-Amplifikats einen Rückschluss auf eine erfolgreiche erste bzw. zweite Red-Rekombination.

Zellmaterial von Plattenkolonien wurde mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze in mit PCR-Mastermix versehene PCR-Reaktionsansätze eingetaucht und nachfolgend zur Animpfung der jeweiligen Kolonie in antibiotikahaltiges LB-Medium überführt. Für die PCR-Amplifikation wurde die Platinum® *Taq* DNA-Polymerase (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers verwendet. Als DNA-Matrize diente die Bacmid-DNA der jeweiligen Bakterienkolonie.

B.2.3.6 Aufreinigung von viraler DNA

Virale genomische DNA wurde über zwei Verfahren isoliert:

Für die Verwendung als Matrize für PCR-Amplifizierungen wurde virale genomische DNA aus 1 ml Virusstock-Aliquots mit Hilfe des DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers gereinigt (vgl. B.2.2.3). Abweichend wurden nach dem Abstoppen der Proteinase K-Inkubation 5 µg poly dA:dT-DNA zu der Virussuspension gegeben, um eine Bindung der viralen DNA an die Silikamatrix der Säule zu verstärken.

Für die Isolation von größeren Mengen viraler genomischer DNA wurden von dem entsprechenden Virus 60 ml Virusstock erzeugt (vgl. B.2.2.3). Der Zellkulturüberstand wurde bei 2000 x g zentrifugiert, abgenommen und die Virus-Partikel in der Ultrazentrifuge eine Stunde bei 25.000 rpm und 4°C pelletiert. Die Viruspartikel wurden in 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM MgCl₂ und 100 mg/ml Rinderserumalbumin (BSA) resuspendiert. Für den vollständigen Abbau der zellulären DNA und RNA bzw. der nicht verpackten viralen genomischen DNA wurde der Ansatz mit 1750 Einheiten Benzonase für 90 min bei RT inkubiert. Die Inaktivierung der Benzonase erfolgte durch die Zugabe von 40 µl 0,5 M Ethylendiamintetraacetat (EDTA). Nachfolgend wurde die virale genomische DNA mit Hilfe des Nucleobond CB Kit (Machery Nagel)

nach Angaben des Herstellers gereinigt. Abweichend vom Protokoll wurde die Probe vor der Überführung auf die Säule auf einen pH von 6,2 bis 6,5 eingestellt, um die Bindung der viralen genomischen DNA an die Silica-Matrix der Säule zu gewährleisten.

B.2.3.7 Analyse der viralen DNA-Replikation

Subkonfluente in 24-Lochplatten ausgesäte NHDF-Zellen wurden mit AD169 (MOI 0,1) infiziert. Zwei Stunden nach Infektion wurde das Virusinokulum entfernt. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit PBS gewaschen und mit Placebo bzw. mit antiviralen Substanzen, verdünnt in NHDF-Kulturmedium, inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion wurde jeweils die Gesamtzell-DNA mit Hilfe des DNAeasy Tissue 96 kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Zur Bestimmung der Anzahl an HCMV-Genomkopien wurde eine quantitative *Real-Time*-PCR durchgeführt (184).

Diese wurde jeweils in einem 25 µl Reaktionsansatz, versehen mit 12,5 µl TaqMan PCR-Mastermix (Applied Biosystems), durchgeführt. Als Matrize wurde entsprechend 5 µl an Gesamtzell-DNA, 5 µl HCMV-Standard bzw. 5 µl an Interleukin 8 (IL8) Standard verwendet.

Primer und Sonden (*Probe*) wurden in einer Konzentration von 200 nM eingesetzt. Jede DNA-Probe wurde in Vierfachbestimmung analysiert. Die Anzahl an HCMV-Genomkopien wurde über die Amplifizierung der HCMV *major immediate-early*-Region mit den Primern 5' CMV-TM, 3' CMV-TM sowie der FAM/TAMRA gekoppelten CMV-Probe quantifiziert (vgl. Tab. 6). Um das Verhältnis der Menge an HCMV-Genomkopien zur Gesamtzellzahl ermitteln zu können, wurden die zellulären Interleukin 8 - (IL8) Kopien mit Hilfe der Primer FW IL8, RW IL8 und der FAM/TAMRA gekoppelten Probe IL8 ermittelt (vgl. Tab. 6). Als quantitativer Standard für die Bestimmung der Anzahl an HCMV-Genomkopien wurde die HCMV-*major immediate-early*-Region mit gereinigter AD169-DNA als Matrize sowie den Primern 5' CMV-ST und 3' CMV-ST amplifiziert. Der IL8 DNA-Standard wurde über eine IL8 PCR-Amplifizierung genomischer DNA primärer Blutmonozyten (PBMC), mit den Primern FW IL8 und RW IL8, nach Standardprotokoll erstellt (vgl. B 2.3.5 und Tab. 6) (184).

Für die *Real-Time*-PCR wurde der ABI Prism 7700 (Applied Biosystems) nach Vorgaben des Herstellers verwendet (vgl. Tab. 25).

Tab. 25: Zyklenabfolge der *Real-Time*-PCR

<i>Real-Time</i>-PCR Programm		
1. Initiale Denaturierung	50°C	2 min ^a
2. Denaturierung	95°C	10 sek ^b
3. Annealing	95°C	15 sek
4. Elongation	60°C	1 min
Anzahl der Zyklen	40	

^amin: Minute^bsek: Sekunde

B.2.4 Proteinbiochemische Methoden

B.2.4.1 Immunfluoreszenzanalyse

Für die Immunfluoreszenzanalyse wurden transient transfizierte HeLa-Zellen bzw. mit HCMV infizierte NHDF-Zellen in 6-Lochplatten auf 24 x 24 mm Glasdeckelchen kultiviert. 24 Stunden nach der Transfektion bzw. 72 Stunden nach Infektion wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellfixierung erfolgte entweder mit eiskaltem Methanol (vgl. B.2.2.4) oder mit 4% Paraformaldehyd in PBS für 10 min bei RT. Paraformaldehydfixierte Zellen wurden nachfolgend zweimal mit PBS gewaschen und mit 0.2% Triton X-100 in PBS für 20 min bei 4°C permeabilisiert. Sowohl die in PBS rehydrierten methanolfixierten Zellen als auch die mit Paraformaldehyd fixierten Zellen wurden für 20 min bei 37°C in 5% FKS in PBS blockiert. Zur Absättigung des zellulären FC-Rezeptors wurden infizierte Zellen mit CohnII-Lösung (10 mg/ml in PBS) für 30 min bei 37°C blockiert. Die Zellen wurden nachfolgend mit dem entsprechenden Primärantikörper für 30 min bei 37°C inkubiert, dreimal mit PBS gewaschen und für weitere 30 min bei 37°C mit dem entsprechenden Zweitantikörper inkubiert (vgl. Tab. 19 und 20). Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden die Präparate auf Objektträgern in Eindeckelmedium (Vectashield HardSet Mounting, Biozol), dem der DNA-interkalierende Farbstoff 4,6-Diamidin-2-phenylindol (Dapi) zugesetzt ist, fixiert. Die Bilddokumentation erfolgte mittels eines Fluoreszenzmikroskops der Firma Leica (Leica DMRB) verbunden mit einer CCD Spot Flex Kamera (Visitron Systems).

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von Spot Advanced (Visitron Systems), Corel Draw12 (Corel Corporation) und Paint Net (<http://www.getpaint.net>).

B.2.4.2 Immunoblotanalyse

In 6-Lochplatten kultivierte, mit AD169 (MOI 0,1) infizierte NHDF-Zellen wurden zwei Stunden nach Infektion mit Placebo bzw. mit antiviraler Substanz, verdünnt in NHDF-Kulturmedium, inkubiert. 12, 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Infektion wurden die Zellen dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen mit 250 µl Ripa-Lysepuffer, versehen mit Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail (Roche), für 5 min bei 4°C inkubiert. Die lysierten Zellen wurden abgeschabt und in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Im Anschluss wurden die Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und nachfolgend bei -80°C gelagert. Zur weiteren Prozessierung wurden die Lysate auf Eis aufgetaut und 60 min bei 17900 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert und als Gesamtzellproteinlysate verwendet. 20 µl der jeweiligen Gesamtzellproteinlysate wurden mit 6 x SDS Probenpuffer versehen und über ein 10%iges Bis-Tris Polyacrylamidgel (Novex NuPAGE, Invitrogen) ihrem Molekulargewicht nach aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine über eine Western-Blot-Apparatur (Mini Trans-Blot Cel, Biorad) auf eine Nitrocellulosemembran (0,2 µm Porengröße, Schleicher und Scholl) transferiert.

Zur Absättigung von unspezifischen Bindungen wurde die Nitrocellulosemembran eine Stunde mit einer 5%igen Magermilchpulverlösung (Lasana Magermilchpulver, Humana Milchunion, gelöst in PBS/0,1% Tween20) inkubiert. In Zellkulturüberstand sezernierter Antikörper wurde für die Primärantikörperinkubation unverdünnt verwendet. Aufkonzentrierter Antikörper wurde in einer 3%igen Magermilchpulverlösung entsprechend verdünnt (vgl. Tab 19). Die Primärantikörperinkubation erfolgte für eine Stunde bei RT bzw. ü.N. bei 4°C.

Nach viermaligem Waschen für 20 min in PBS/0,1% Tween 20 und weiteren viermal für 5 min, wurde die Membran für eine Stunde bei RT mit einem *Horseradish*-Peroxidase- (HRP) gekoppelten Zweitantikörper inkubiert (vgl. Tab. 20). Die Membran wurde nachfolgend erneut viermal für 20 min und weitere viermal für 5 min mit PBS/0,1% Tween 20 gewaschen. Die Proteindetektion erfolgte mit ECL- bzw. ECL-Plus-Lösung (GE Healthcare) nach Angaben des Herstellers. Die Lichtemission wurde mit Hilfe des Lumi Imager (Roche) detektiert.

Mittels einer Inkubation in *stripping*-Puffer (Roti-Free Stripping Buffer, Roth) konnten die Antikörper anschließend von der Nitrocellulosemembran wieder entfernt werden.

Nach intensivem Waschen in PBS/0,1% Tween 20 wurde die Membran erneut in 5%iger Magermilchpulverlösung eine Stunde bei RT oder ü.N. inkubiert. Es folgte eine weitere Erst- und Zweitantikörperinkubation.

C. Ergebnisse

Hochdurchsatzscreenings und nachfolgende Leitstrukturoptimierungen führten zur Identifizierung der neuartigen antiviralen Moleküle AIC246, AIC2 und AIC3, die sich durch eine ausgezeichnete Anti-HCMV-Aktivität sowie exzellente präklinische Daten auszeichnen und sich konsequenterweise in der klinischen Entwicklung befinden. In dieser Arbeit werden die antiviralen Wirkmechanismen dieser neuartigen niedermolekularen HCMV-Inhibitoren charakterisiert.

C.1 Analysen zur Bestimmung des Zeitpunkts des inhibitorischen Effekts der AIC-Substanzen innerhalb des HCMV-Replikationszyklus

Um den Zeitpunkt des antiviralen Effekts der AIC-Substanzen innerhalb des HCMV-Replikationszyklus zu bestimmen, wurden in einem ersten Schritt *Time-of-Addition*-Experimente durchgeführt (vgl. B.2.2.7) (vgl. Abb. 17). Dabei werden mit HCMV infizierte Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion mit Substanz versehen (vgl. Abb. 17, A). Wird die antivirale Substanz innerhalb des viralen Replikationszyklus vor dem Prozess verabreicht, den diese inhibiert, kann sich deren antivirale Wirksamkeit entfalten. Wird die Substanz danach verabreicht, geht deren antivirale Wirkung verloren (vgl. Abb. 17).

Als Referenzinhibitoren für die frühe (E) und späte (L) Phase des viralen Replikationszyklus wurden GCV bzw. Bay 38-4766 verwendet (195, 244). Während GCV innerhalb der frühen Phase der Virusreplikation die Elongation der DNA-Synthese reprimiert, inhibiert Bay 38-4766 in der späten Phase die Prozessierung und Verpackung der viralen genomischen DNA (vgl. A.3.2.1 und A.3.4.1) (45, 195, 200, 244).

Mit RV-HG (HCMV-AD169 mit einer stabil in die *unique-short*-Region inserierten EGFP-Expressionskassette) infizierte normale humane Hautfibroblasten (*normal human dermal fibroblast*, NHDF) wurden mit Placebo bzw. mit antiviraler Substanz (10 x EC₅₀ AIC246, AIC2, AIC3, GCV bzw. Bay 38 47-66) zu verschiedenen Zeiten nach Infektion (2, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 78, 96 und 120 Stunden) versehen (vgl. Abb. 17, A) (34). 120 Stunden nach Infektion wurde die substanzvermittelte Inhibition

der Virusreplikation über die relative Fluoreszenzreduktion im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bestimmt (vgl. Abb. 17).

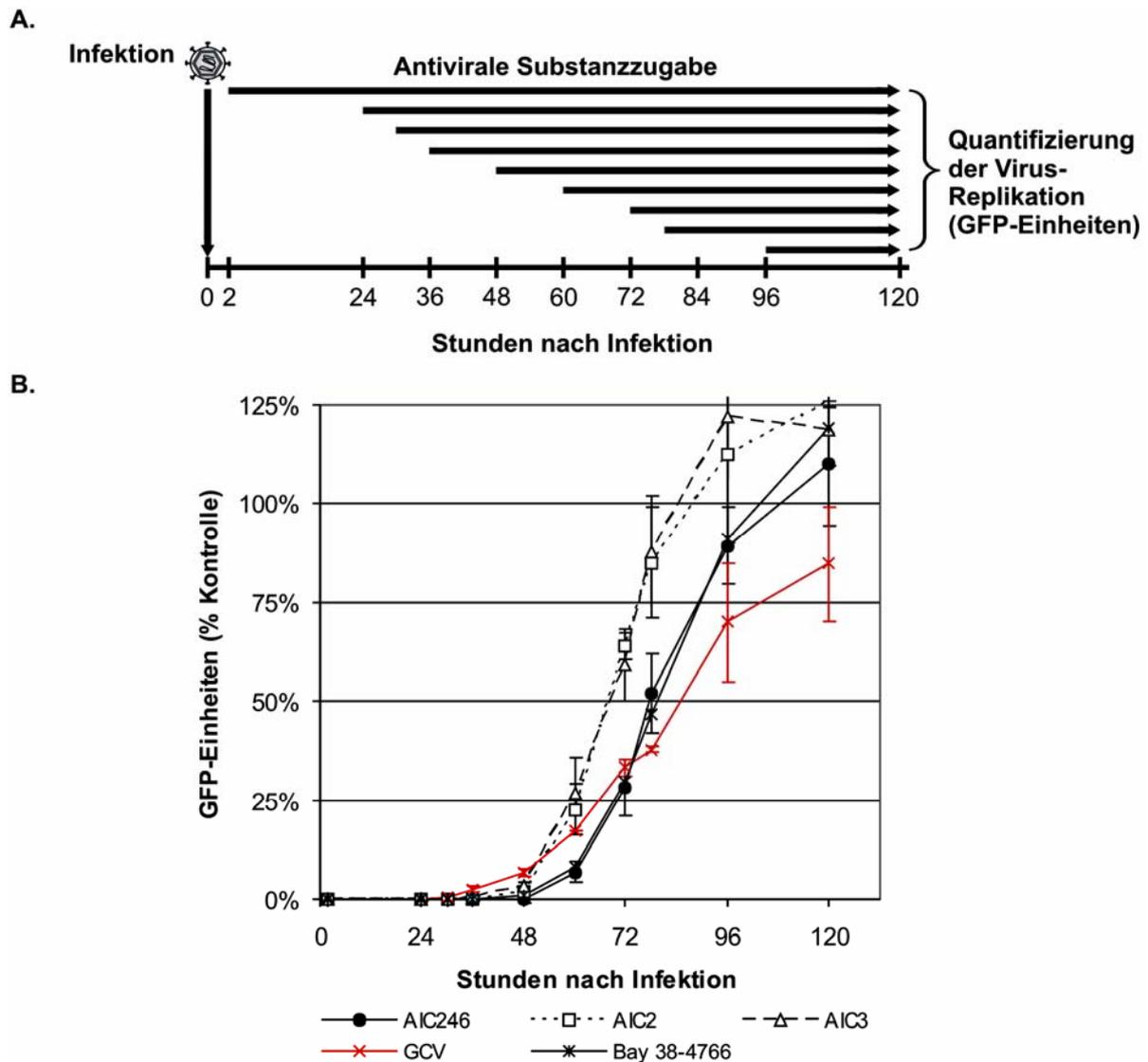


Abb. 17: Bestimmung des Zeitpunkts des inhibitorischen Effekts der Substanzen AIC246, AIC2, AIC3, Bay 38-4766 und GCV innerhalb des HCMV-Replikationszyklus

(A) Schematische Darstellung des Experiments. Mit RV-HG infizierte NHDF-Zellen wurden jeweils mit $10 \times EC_{50}$ AIC246, AIC2, AIC3, GCV bzw. Bay 38-4766 zu den im Diagramm angegebenen Stunden nach Infektion versehen. Nach 120 Stunden wurde die Virusreplikation über die Intensität der EGFP-Expression der infizierten Zellen bestimmt (vgl. B.2.2.6 und B.2.2.7). EC_{50} : Substanzkonzentration die einen halbmaximalen inhibitorischen Effekt induziert.

(B) Dargestellt ist die relative prozentuale Intensität der EGFP-Expression von mit HCMV-infizierten, substanzbehandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Ergebnisse stellen den Durchschnitt von drei voneinander unabhängigen Experimenten dar. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Die Ergebnisse (zusammengefasst in Abbildung 17 B) zeigten, dass die Kontrollen GCV und Bay 38-4766 - wie erwartet - ihren inhibitorischen Effekt in der frühen bzw. späten Phase des viralen Replikationszyklus vermitteln. So konnte GCV bis zu 30 Stunden nach Infektion zugeführt werden, ohne seine antivirale Wirksamkeit zu verlieren, was sich mit den Erwartungen für einen Polymeraseinhibitor deckt. Bei späterer Verabreichung ging dessen antivirale Aktivität sukzessive über den zeitlichen Verlauf des Experiments zurück (vgl. Abb. 17 B) (126, 127). Bay 38-4766 dagegen erhielt seine antivirale Aktivität bis zu einer Verabreichung bei 52 Stunden nach Infektion. Diese Beobachtung deckt sich mit den Erwartungen für eine Inhibition der Terminaseaktivität in der späten Phase des HCMV-Replikationszyklus. Bei nachfolgenden Substanzverabreichungen nahm die antivirale Aktivität von Bay 38-4766 stark ab (vgl. Abb. 17 B).

Alle AIC-Substanzen erhielten ihre antivirale Wirkung bis in die späte Phase des viralen Replikationszyklus. Bei 46 Stunden nach Infektion nahm die antivirale Aktivität von AIC2 und AIC3 abrupt ab (vgl. Abb. 17 B). Dabei deutete der deckungsgleiche Kurvenverlauf beider Substanzen darauf hin, dass sie einen gemeinsamen Prozess inhibieren, obwohl sie unterschiedlichen Substanzklassen zuzuordnen sind (vgl. Abb. 17 B). Demgegenüber behielt AIC246 - wie Bay 38-4766 - seine antivirale Aktivität bis zu einer Verabreichung bei ca. 52 Stunden nach Infektion. Wie schon bei Bay 38-4766 nahm auch für AIC246 dessen antivirale Aktivität bei den nachfolgenden Substanzverabreichungen stark ab (vgl. Abb. 17 B). Die nahezu identische Kinetik beider Substanzen führt dabei zu der Vermutung, dass AIC246 wie Bay 38-4766 in der späten Phase des HCMV-Replikationszyklus mit der Prozessierung der Verpackung der viralen genomischen DNA in das Nukleokapsid interferiert (vgl. Abb. 17 B).

C.2 Einfluss der AIC-Substanzen auf die virale DNA-Synthese

Zur Bestätigung, dass die AIC-Substanzen in der späten Phase der HCMV-Replikation ihre antivirale Aktivität entfalten, wurde der Einfluss von AIC246, AIC2 und AIC3 auf die virale DNA-Synthese - einem Prozess der frühen Phase der HCMV-Replikation - analysiert. Hierfür wurde die Kinetik der Akkumulation von viraler genomischer DNA in infizierten Zellen untersucht. HCMV-AD169-infizierte NHDF-Zellen wurden mit Placebo bzw. antiviraler Substanz ($10 \times EC_{50}$ AIC246, AIC2, AIC3

bzw. GCV) zwei Stunden nach Infektion inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion (2, 24, 29, 43, 52, 77, 91 und 96 Stunden) wurde die Gesamtzell-DNA der infizierten Zellen isoliert und die Anzahl viraler Genomkopien mittels quantitativer *Real-Time-PCR* (qPCR) bestimmt (vgl. Abb. 18, B.2.3.7).

Wie erwartet, führte eine Inkubation mit dem Polymeraseinhibitor GCV zu einer drastischen Reduktion von neu synthetisierter viraler genomischer DNA (vgl. Abb. 18). Im Gegensatz dazu beeinträchtigten weder AIC246, AIC2 noch AIC3 die virale DNA-Synthese. Schlussfolgernd bestätigen diese Experimente: dass i) die AIC-Substanzen ihre antivirale Aktivität erst nach der DNA-Replikation und somit in der späten Phase des HCMV-Replikationszyklus entfalten und ii) sich demnach in ihrem Wirkmechanismus von Polymeraseinhibitoren unterscheiden.

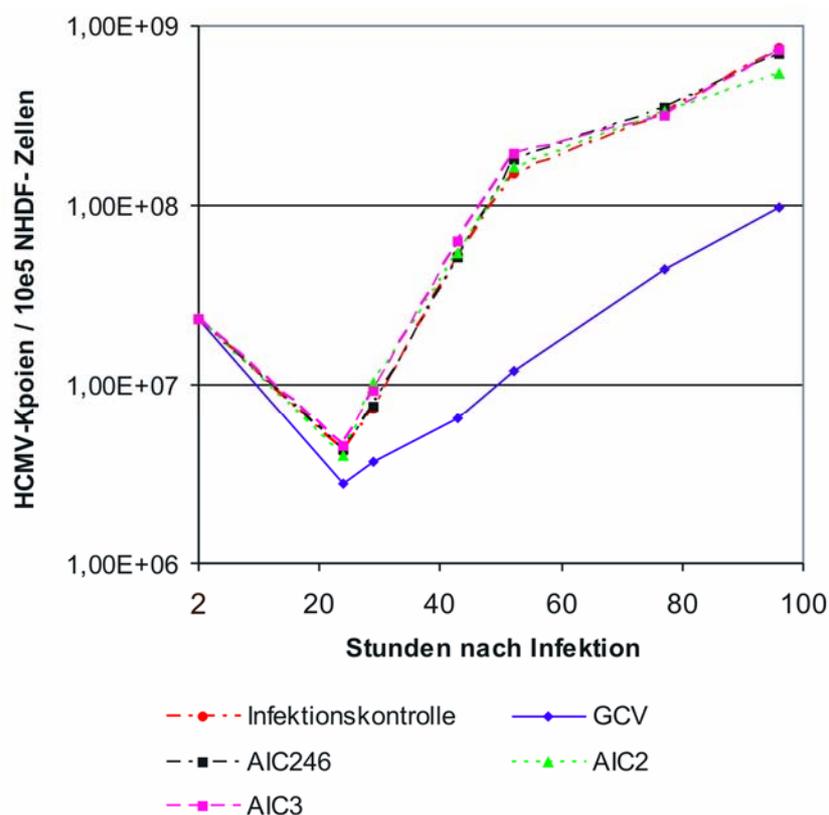


Abb. 18: HCMV DNA-Replikation in Anwesenheit von AIC246, AIC2, AIC3 bzw. GCV

HCMV AD169-infizierte NHDF-Zellen wurden mit $10 \times EC_{50}$ AIC246, AIC2, AIC3 bzw. GCV inkubiert. Zu den abgebildeten Zeitpunkten nach Infektion wurde die Gesamtzell-DNA isoliert und die Anzahl an HCMV-Genomkopien über quantitative *Real-Time-PCR* bestimmt.

C.3 Einfluss der AIC-Substanzen auf die virale Genexpression

C.3.1 Einfluss auf die Akkumulation viraler Markerproteine

Um zu prüfen, ob die AIC-Substanzen die Akkumulation viraler Proteine im Infektionsverlauf beeinflussen, wurden in einem nächsten Schritt NHDF-Zellen mit HCMV-AD169 und einer Multiplizität der Infektion (*multiplicity of infection*, MOI) von 0,1 infiziert und zwei Stunden nach Infektion jeweils mit Placebo bzw. mit antiviraler Substanz ($10 \times EC_{50}$ AIC246, AIC2, AIC3 bzw. GCV) versehen.

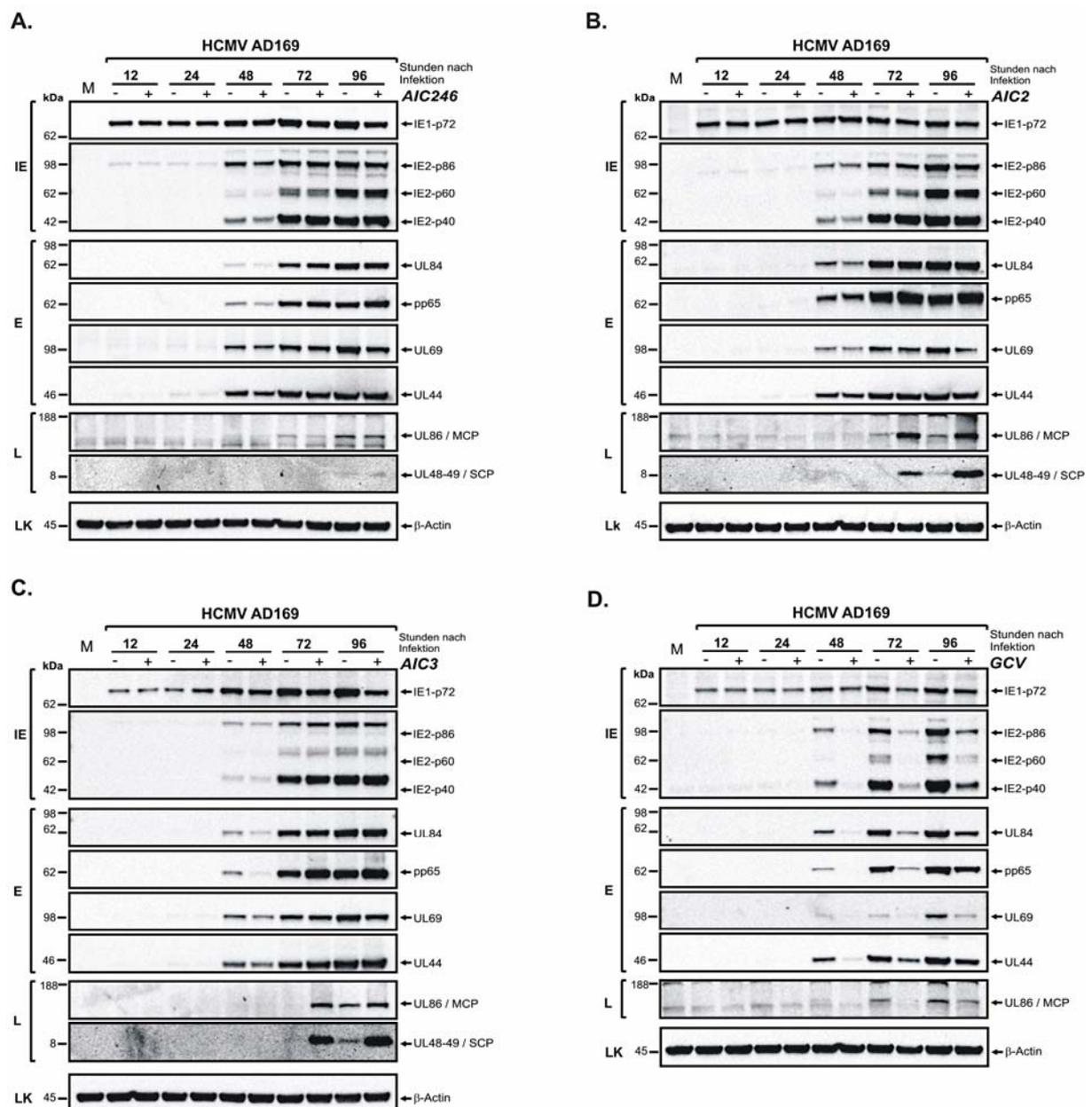


Abb. 19: Einfluss der Substanzen AIC246, AIC2 bzw. AIC3 auf die Proteinexpression und -akkumulation im Vergleich zu Ganciclovir

Abb. 19: Fortgesetzt

NHDF-Zellen wurden mit HCMV-AD169 infiziert (MOI 0,1) und anschließend mit jeweils $10 \times EC_{50}$ AIC246 (**A**), AIC2 (**B**), AIC3 (**C**) bzw. GCV (**D**) versehen. Zu den angegebenen Zeitpunkten (12, 24, 48, 72 bzw. 96 Stunden nach Infektion) wurden die Zellen lysiert und für die Immunoblotanalyse prozessiert. Die jeweiligen HCMV IE-, E- bzw. L-Proteine wurden mit spezifischen Antikörpern (vgl. Tab. 19 und 20) visualisiert. Ladekontrolle (LK): Zelluläres β -Aktin. Der Größenstandard (kDa) ist linksseitig gekennzeichnet. M: Nicht infizierte Zellen (Mock).

Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion (12, 24, 48, 72 und 96 Stunden) wurden Gesamtzelllysate präpariert und nachfolgend durch Immunoblotanalysen charakterisiert (vgl. Abb. 19).

Die Immunoblotanalysen, zusammengefasst in Abbildung 19, zeigten keine AIC246-, AIC2- bzw. AIC3-abhängige Veränderung der Akkumulation von viralen Markerproteinen der IE- (IE1 und IE2) und E-Phase (UL84, pp65, UL69 und UL44). Ebenso war in der späten Phase keine Veränderung der MCP- bzw. SCP-Expression unter Behandlung mit AIC246 zu erkennen (vgl. Abb. 19). Im Unterschied zu AIC246-behandelten Zellen nahm, in Anwesenheit von AIC2 bzw. AIC3, die Proteinakkumulation der L- (*late*)-Strukturproteine MCP und SCP im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle 72 bzw. 96 Stunden nach Infektion drastisch zu (vgl. Abb. 19). Als Kontrolle wurden auch Zellen mit GCV behandelt. Wie erwartet, führte der Polymeraseinhibitor GCV erst 48 Stunden nach Infektion (E) zu einer deutlichen Reduktion der Akkumulation von viralen Proteinen der späten Phase der Virusreplikation (vgl. Abb. 19).

Zusammengefasst war unter Behandlung von AIC246 keine modifizierte Proteinakkumulation von viralen Markerproteinen der IE-, E- und L-Phase zu beobachten. Dagegen führten AIC2 und AIC3 zu einem deutlichen Anstieg der Akkumulation von L-Strukturproteinen wie z.B. MCP und SCP. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass AIC2 und AIC3 denselben Prozess inhibieren und dass sich deren molekularer Wirkmechanismus von dem AIC246-inhibierten molekularen Wirkmechanismus unterscheidet.

C.3.2 Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation von viralen Markerproteinen

Da bei AIC246 keine veränderte Proteinakkumulation und bei AIC2 und AIC3 eine Zunahme der Akkumulation von L-Strukturproteinen zu beobachten war, wurde nachfolgend untersucht, ob in Anwesenheit von Substanz ein Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation der untersuchten Markerproteine zu beobachten ist.

Zu diesem Zweck wurden Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt. AD169-infizierte NHDF-Deckglaskulturen (MOI 0,1) wurden mit Placebo bzw. mit AIC246, AIC2 bzw. AIC3 (10 x EC₅₀) versehen und 72 Stunden nach Infektion fixiert. Im Anschluss erfolgten indirekte Ko-Immunfluoreszenzanalysen mit Antikörpern, gerichtet gegen Markerproteine der sehr frühen (α IE1, α IE2), frühen (α UL84) bzw. späten (α MCP, α SCP) Phase des viralen Replikationszyklus (vgl. Abb. 20, 21, 22; Tab. 19, 20 und B.2.4.1).

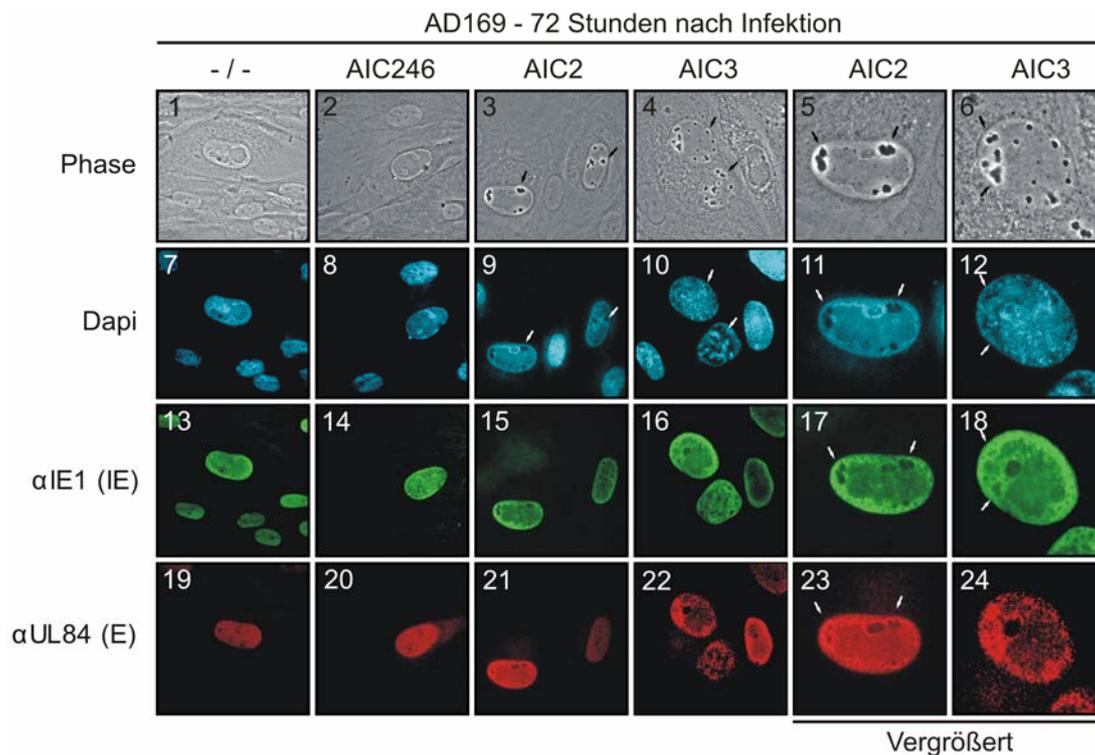


Abb. 20: Analyse der intrazellulären Verteilung von IE- und E-Markerproteinen unter Einfluss von AIC246, AIC2 bzw. AIC3

HCMV-AD169-infizierte NHDF-Zellen (MOI 0,1) wurden mit Placebo bzw. 10 x EC₅₀ AIC246, AIC2 oder AIC3 inkubiert. 72 Stunden nach Infektion wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert. Die Expression der Proteine wurde über eine indirekte Ko-Immunfluoreszenz mit einem monoklonalen anti-IE- bzw. einem polyklonalen anti-UL84-Antikörper sowie den anti-Maus/Alexa 488 (grün) bzw. anti-Kaninchen/Alexa 555 (rot) als Sekundäntikörper durchgeführt. Die Zellkerne wurden über den DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (Dapi) dargestellt (blau).

Wie in der Literatur beschrieben, waren in unbehandelten Zellen pIE1 und pUL84 im Zellkern lokalisiert, wo sie gleichmäßig verteilt vorlagen (vgl. Abb. 20; 13 und 19) (273, 274). In Anwesenheit von AIC246, AIC2 bzw. AIC3 war keine Veränderung hinsichtlich der Expression und Lokalisation von pIE1 bzw. pUL84 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ersichtlich (vgl. Abb. 20; 13 - 24). Allerdings konnten - im Gegensatz zu AIC246-behandelten infizierten Zellen - in der Phasenkontrastaufnahme AIC2- bzw. AIC3-behandelter infizierter Zellen intranukleäre Einschlüsse beobachtet werden, die weder mit pIE1 noch mit pUL84 kolokalisierten (vgl. Abb. 20; 3 - 6, Pfeilmarkierung und Vergrößerung).

Als nächstes wurde das zentrale Markerprotein der späten Phase des HCMV-Replikationszyklus - das Hauptkapsidprotein MCP - untersucht (vgl. Abb. 21).

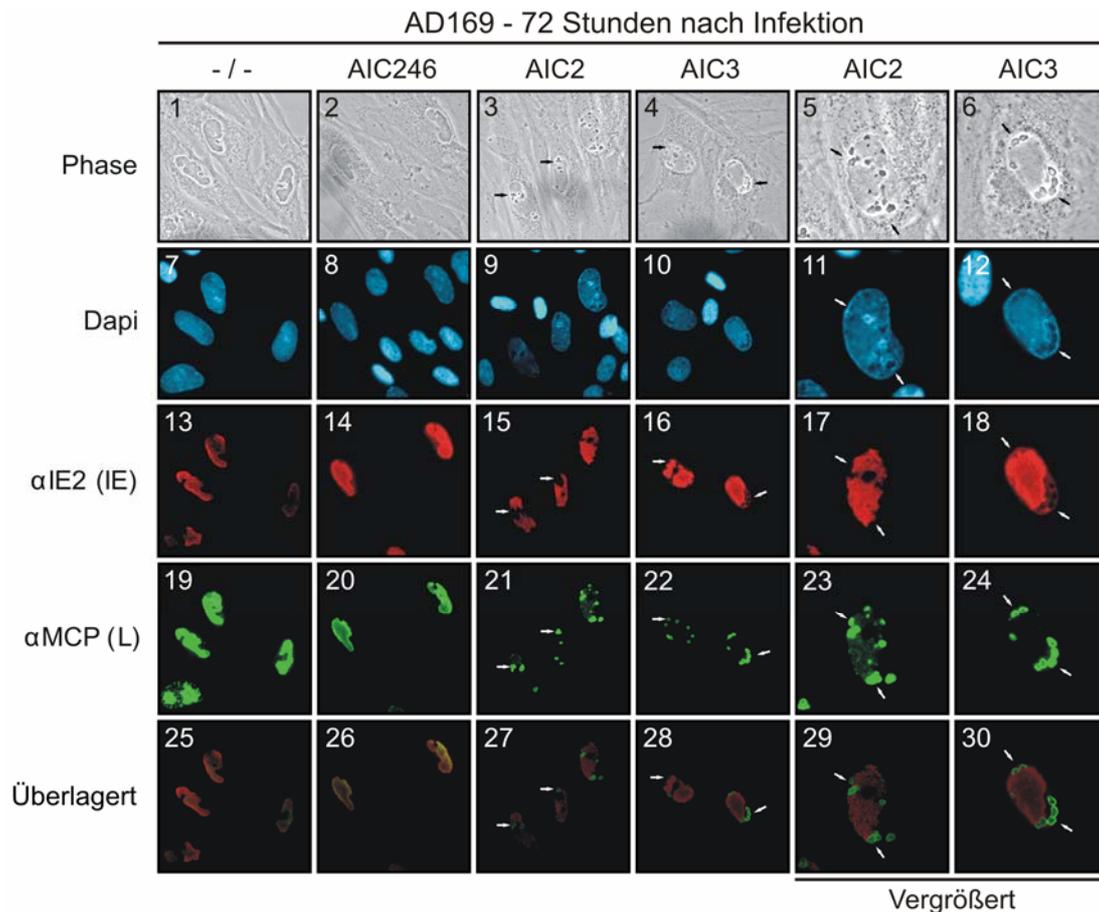


Abb. 21: Analyse der intrazellulären Verteilung des L-Strukturproteins MCP unter Einfluss von AIC246, AIC2 bzw. AIC3

Abb. 21: Fortgesetzt

HCMV-AD169-infizierte NHDF-Zellen (MOI 0,1) wurden mit Placebo bzw. mit AIC246, AIC2 bzw. AIC3 (10 x EC₅₀) versehen. 72 Stunden nach Infektion wurden die Zellen fixiert. Eine indirekte Ko-Immunfluoreszenz wurde mit einem polyklonalen anti-IE2-Antikörper zur Markierung der viralen Replikationskompartimente sowie mit einem monoklonalen anti-MCP-Antikörper durchgeführt. Als Sekundärantikörper wurden anti-Kaninchen/Alexa 555 (rot) bzw. anti-Maus/Alexa 488 (grün) verwendet. Die Zellkerne wurden mit Dapi (blau) dargestellt.

Dabei zeigte sich in Anwesenheit von AIC246 keine Veränderung der Lokalisation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (vgl. Abb. 21; 20). Wie in der Literatur beschrieben, akkumulierten sowohl der Transaktivator IE2 als auch das *major capsid protein* in der späten Phase der Virusreplikation in sogenannten viralen Replikationskompartimenten des Zellkerns (vgl. Abb. 21; 13 - 14, 19 - 20, 25 - 26) (15, 172). Im Gegensatz dazu war bei den mit AIC2 bzw. AIC3 behandelten infizierten Zellen innerhalb der Replikationskompartimente keine gleichmäßige Verteilung von MCP zu beobachten (vgl. Abb. 21; 21 - 24, Pfeilmarkierung und Vergrößerung). Stattdessen kolokalisierte das L-Strukturprotein mit den bereits in der Phasenkontrastaufnahme erkennbaren intranukleären Inklusionen, die sich von den Replikationskompartimenten abgrenzten (vgl. Abb. 21; 15 - 18, 27 - 30, Pfeilmarkierung und Vergrößerung). Die Replikationskompartimente waren in der Immunfluoreszenz deutlich zu erkennen und unterschieden sich - bedingt durch die Abschnürungen des L-Strukturproteins - deutlich in ihrer Struktur von denen der unbehandelten Kontrolle (vgl. Abb. 21; 13 und 15 - 18, Pfeilmarkierung und Vergrößerung).

Um zu überprüfen, ob AIC2 bzw. AIC3 auch die intrazelluläre Lokalisation anderer L-Strukturproteine beeinflussen, wurde in einem analogen Experiment die Lokalisation des L-Strukturproteins SCP untersucht. Die Ergebnisse, zusammengefasst in Abbildung 22, zeigten in der unbehandelten Kontrolle in den Replikationskompartimenten des Zellkerns eine Kolokalisation von SCP und pIE2 (vgl. Abb. 22; 13, 19 und 25). In Anwesenheit von AIC246 war im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle keine Veränderung hinsichtlich der Lokalisation von IE1 bzw. SCP zu beobachten (vgl. Abb. 22; 14, 20 und 26). In Anwesenheit von AIC2 bzw. AIC3 war - wie bei MCP - keine gleichmäßige Verteilung von SCP innerhalb der Replikationskompartimente zu erkennen (vgl. Abb. 22; 21 - 24, Pfeilmarkierung und

Vergrößerung). Stattdessen waren auch hier intranukleäre SCP-Aggregate zu beobachten, die mit den in der Phasenkontrastaufnahme erkennbaren Inklusionen kolokalisierten und sich von den Replikationskompartimenten abgrenzten (vgl. Abb. 22; 3 - 6 und 27 - 30 Pfeilmarkierung und Vergrößerung). Diese Beobachtung entspricht den Erwartungen, da SCP bereits in Zytoplasma an MCP gebunden vorliegt und in den Zellkern transportiert wird (57, 111). Es stellte sich jedoch die Frage, ob auch andere an der Bildung des viralen Nukleokapsids beteiligten HCMV-Strukturproteine nach einer Behandlung mit AIC2 bzw. AIC3 innerhalb der intranukleären Inklusionen lokalisieren.

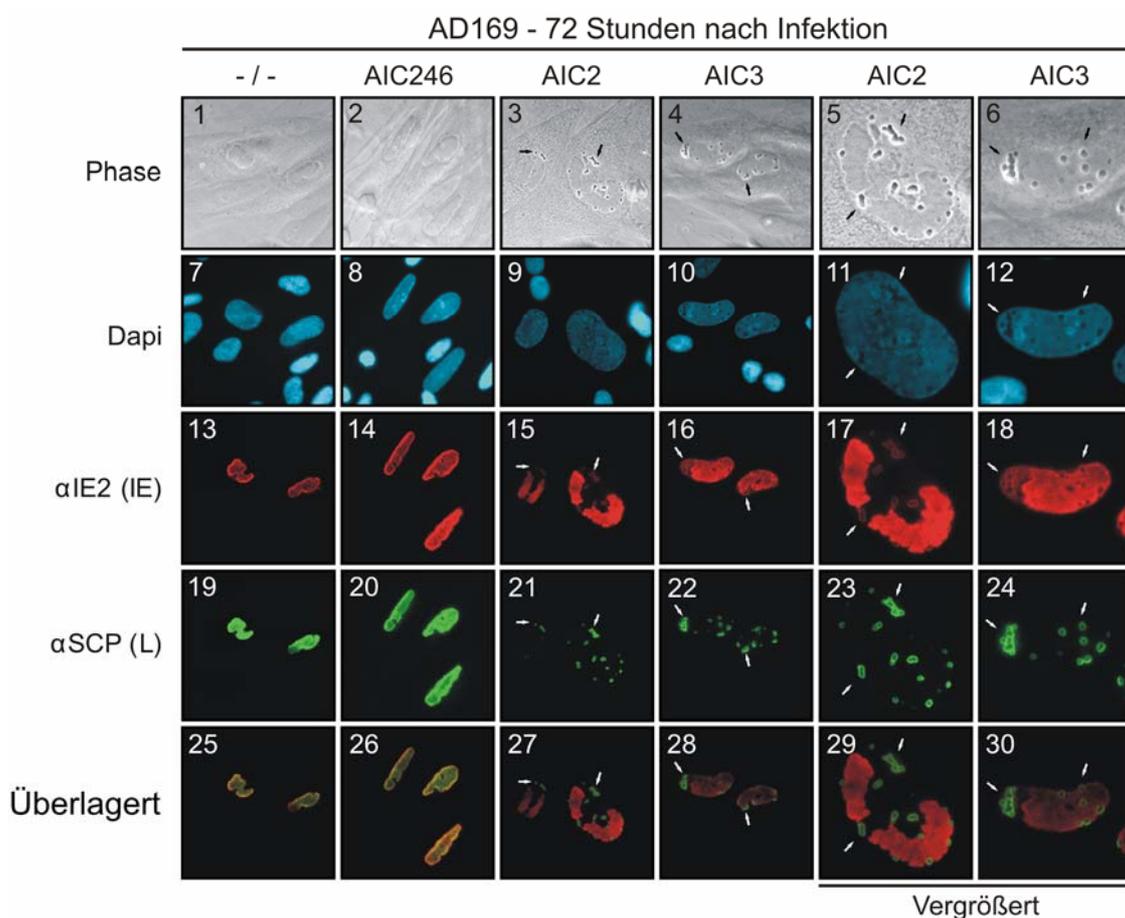


Abb. 22: Analyse der intrazellulären Verteilung des L-Strukturproteins SCP in Anwesenheit von AIC246, AIC2 bzw. AIC3

Mit HCMV-AD169-infizierte NHDF-Zellen (MOI 0,1) wurden mit Placebo bzw. mit $10 \times EC_{50}$ AIC246, AIC2 oder AIC3 versehen. 72 Stunden nach Infektion wurden die Zellen fixiert. Eine indirekte Ko-Immunfluoreszenz wurde mit den polyklonalen anti-pHM178- und einem monoklonalen anti-SCP-Antikörper durchgeführt. Als Sekundärantikörper wurden anti-Kaninchen/Alexa 555 (rot) bzw. anti-Maus/Alexa 488 (grün) verwendet. Die Zellkerne wurden mit Dapi (blau) dargestellt.

Zusammenfassend war bei mit AD169-infizierten NHDF-Zellen in Anwesenheit von AIC246, AIC2 bzw. AIC3 keine veränderte Lokalisation von IE- und E-Proteinen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu erkennen. Allerdings unterschieden sich AIC2- und AIC3-behandelte infizierte Zellen von AIC246-behandelten Zellen durch die in der Phasenkontrastaufnahme erkennbaren intranukleären Inklusionen. Diese kolokalisierten vollständig mit den L-Strukturproteinen MCP und SCP und grenzten sich von den Replikationskompartimenten ab.

C.3.3 Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation transient exprimierter Strukturproteine

Aufgrund der Beobachtung, dass AIC2 und AIC3 in mit HCMV infizierten Zellen eine intranukleäre Aggregation von L-Strukturproteinen induzierten, stellt sich die Frage, ob bei transient exprimierten Strukturproteinen ein vergleichbarer Effekt zu beobachten ist oder ob sich die Inklusionen nur im Rahmen einer Virusinfektion ausbilden (112, 333). Daher wurden die offenen Leserahmen der Strukturproteine UL86 (MCP), UL80a (pPR) bzw. UL80.5 (pAP) mit dem eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1+ (Invitrogen) einfach (UL86) bzw. als Flag-Fusionsprotein (UL80a, UL80.5) ligiert (vgl. Tab. 10 und 13). Im Anschluss wurden subkonfluente HeLa-Zellen mit den so konstruierten Vektoren transient transfiziert bzw. kotransfiziert und nach einer 24stündigen Inkubation mit Placebo, AIC2 bzw. AIC3 ($10 \times EC_{50}$) fixiert. Nachfolgend wurde die intrazelluläre Lokalisation von MCP mittels eines monoklonalen MCP-Primärantikörpers und die intrazelluläre Lokalisation von pPR bzw. pAP mittels eines polyklonalen anti-Flag-Kaninchen-Antikörpers analysiert (vgl. Abb. 23, 24 und Tab. 19 und 20).

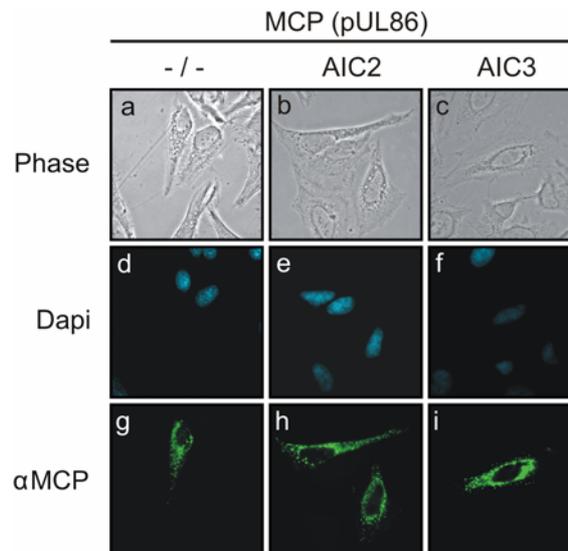


Abb. 23: Darstellung der intrazellulären Lokalisation von transient exprimiertem MCP in HeLa-Zellen in An- bzw. Abwesenheit von AIC2 bzw. AIC3

HeLa-Zellen wurden mit dem Vektor pPLA-1 (pcDNA3.1-UL86) Zellen transfiziert. Unmittelbar danach wurden die Transfektionsansätze mit Placebo, AIC2 bzw. AIC3 ($10 \times EC_{50}$) inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert. Der Nachweis von MCP erfolgte über eine indirekte Immunfluoreszenz mit Hilfe eines monoklonalen anti-MCP-Antikörpers. Als Sekundärantikörper wurde anti-Maus-Alexa 488 (grün) verwendet. Die Zellkerne wurden mit Dapi (blau) gegengefärbt.

Zu Beginn wurde untersucht, ob AIC2 bzw. AIC3 bei transient exprimiertem MCP eine Aggregation induzieren. Transient exprimiertes MCP zeigte - wie erwartet - im Unterschied zu viral exprimiertem Protein eine zytoplasmatische Lokalisation, da MCP ohne die *scaffold*-Proteine pPR bzw. pAP nicht in den Zellkern translozieren kann (vgl. Abb. 23, g) (235). Die Inkubation mit AIC2 bzw. AIC3 führte zu keiner Veränderung der MCP-Lokalisation bzw. -Verteilung (vgl. Abb. 23, h und i).

In einem nächsten Experiment wurde MCP mit pPR bzw. pAP kotransfiziert und nachfolgend der Effekt von AIC2 bzw. AIC3 auf die intrazelluläre Lokalisation der transient exprimierten Proteine untersucht (vgl. Abb. 24 A bzw. B). Unbehandelt lokalisierten alle kotransfizierten Proteine innerhalb des Zellkerns, wobei sie zu Aggregaten assoziiert vorlagen (vgl. Abb. 24, A und B, jeweils g und j). Auch hier führte eine AIC2- bzw. AIC3-Inkubation zu keiner Veränderung der MCP-, pPR- bzw. pAP-Lokalisation bzw. -Verteilung (vgl. Abb. 24, A und B, jeweils h und i bzw. k und l). Dies führt zu dem Schluss, dass AIC2 und AIC3 nur im Kontext einer

Virusinfektion ihren Effekt auf die intrazelluläre Lokalisation von Strukturproteinen vermitteln können.

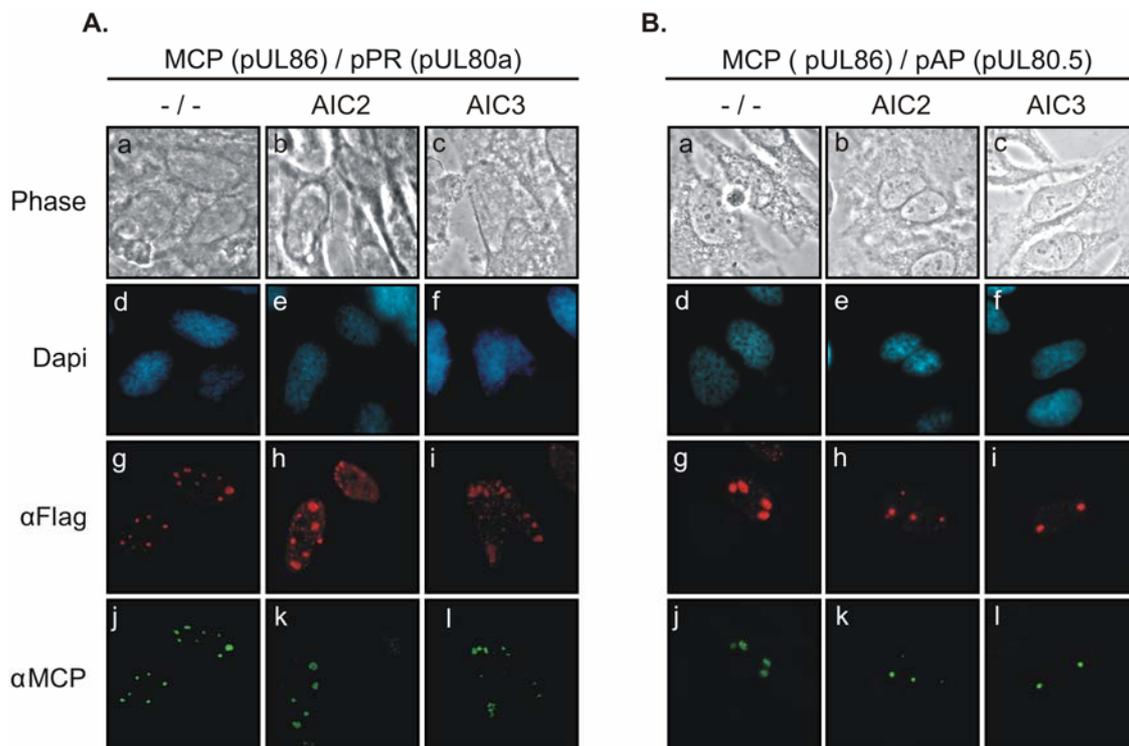


Abb. 24: Intrazelluläre Lokalisation von kotransfiziertem MCP/pPR bzw. MCP/pAP in HeLa-Zellen in An- und Abwesenheit von AIC2 bzw. AIC3

HeLa-Zellen wurden mit den Vektoren pPLA-1 (pcDNA3.1-UL86) und pPLA-11 (pcDNA3.1-UL80a) **(A)** bzw. pPLA-1 (pcDNA3.1-UL86) und pPLA-13 (pcDNA3.1-UL80.5) **(B)** kotransfiziert. Nachfolgend wurden die Transfektionsansätze für 24 Stunden jeweils mit Placebo, AIC2 bzw. AIC3 ($10 \times EC_{50}$) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und einer indirekten Immunfluoreszenz-Analyse unterzogen. Der Nachweis von pPR bzw. pAP erfolgte mit Hilfe eines polyklonalen anti-Flag-Kaninchen-Primärantikörpers, der Nachweis vom MCP mittels monoklonalen Maus-anti-MCP-Primärantikörpers. Als Sekundärantikörper wurden anti-Maus/Alexa 488- (grün) bzw. anti-Kaninchen/Alexa 555 (rot) verwendet. Die Zellkerne wurden mit Dapi (blau) gegengefärbt.

Aufgrund der bisher durchgeführten Experimente kann gefolgert werden, dass AIC246, AIC2 und AIC3 in der späten Phase des HCMV-Replikationszyklus ihren antiviralen Effekt vermitteln. Dabei entfalten AIC2 und AIC3 ihre inhibitorische Wirkung vor AIC246. AIC246 führte zur keiner Veränderung der Genexpression viraler IE-, E- oder L-Markerproteine. AIC2 und AIC3 beeinträchtigten ebenfalls weder die Akkumulation noch die Lokalisation viraler Markerproteine der IE- und E-Phase. Allerdings führten beide Substanzen zu einer intranukleären Aggregation der L-Strukturproteine MCP und SCP, deren Aggregate von den Replikations-

kompartimenten abgegrenzt vorlagen. Die intranukleäre Aggregation war dabei mit einem deutlichen Anstieg der MCP- bzw. SCP-Protein-Akkumulation verbunden.

C.4 Einfluss der AIC-Substanzen auf die Virusmorphogenese

Die zeitgleiche Wirkung von AIC246 und Bay 38-4766 sowie die AIC2- bzw. AIC3-induzierte Aggregation und Akkumulation von Strukturproteinen führte zu der Vermutung, dass die AIC-Substanzen mit der Virusmorphogenese interferieren könnten. Daher wurden die viralen Partikel in der späten Phase der Virusreplikation mit Hilfe von transmissionselektronenmikroskopischen (TEM) Aufnahmen in An- und Abwesenheit von AIC246, AIC2 und AIC3 analysiert. Hierfür wurden humane Vorhautfibroblasten (*human foreskin fibroblasts*, HFF) bzw. humane umbilikale venöse Endothelzellen (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) mit AD169 bzw. dem klinischen Isolat TB40E (endothelzelladaptiert, E) infiziert (MOI 1) und zwei Stunden nach Infektion mit Placebo, AIC246, AIC2 bzw. AIC3 ($10 \times EC_{50}$) inkubiert. Fünf Tage nach Infektion wurden die Zellen fixiert und für die elektronenmikroskopische Analyse präpariert. Die TEM-Daten wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Christian Sinzger (Institut für Virologie, Universität Ulm) generiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt (vgl. Abb. 25).

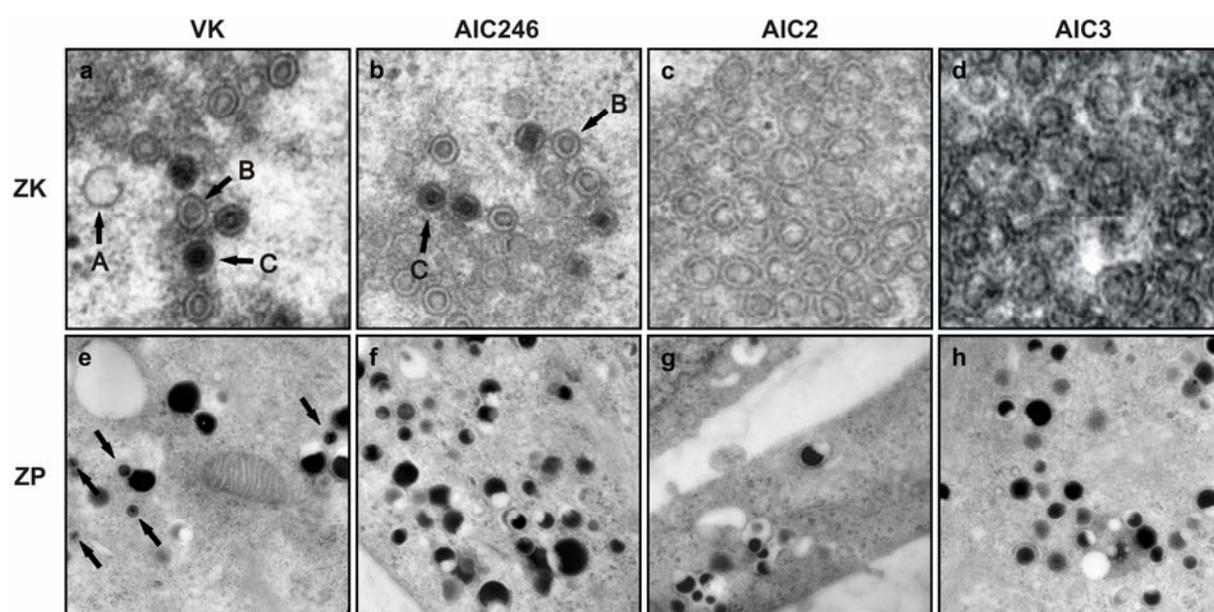


Abb. 25: Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Analyse HCMV-infizierter, mit Placebo (VK), AIC246, AIC2 bzw. AIC3 versetzter HFF- bzw. HUVEC-Zellen

Abb. 25: Fortgesetzt

AD169-infizierte HFF- (a - d) bzw. TB40E-infizierte HUVEC-Zellen (e - h) wurden mit Placebo, AIC246, AIC2 bzw. AIC3 ($10 \times EC_{50}$) inkubiert. Fünf Tage nach Infektion wurden die Zellen fixiert und für die elektronenmikroskopische Analyse präpariert. Pfeile innerhalb des Zellkerns (a - b) kennzeichnen A-, B- und C-Kapside. Pfeile im Zytoplasma (e) kennzeichnen Virionen.

Die Auswertung der unbehandelten Kontrolle ergab, dass im Zellkern reife C-Kapside von den DNA-freien, nur mit *scaffold* gefüllten B- bzw. den vollständig leeren A-Kapsiden unterschieden werden konnten (vgl. Abb. 25 a) (46, 112, 338). Die Analyse der EM-Aufnahmen AIC246-behandelter Zellen zeigte dagegen, dass in Anwesenheit von AIC246 eine signifikante Abnahme an A- und C-Kapsiden verbunden mit einer proportionalen Zunahme an B-Kapsiden zu beobachten war (vgl. Abb. 25 b) und Tab. 26) (117).

Tab. 26: Einfluss von AIC246 auf die Kapsid-Reifung

A-, B, und C-Kapside wurden jeweils in fünf Zellkernen Placebo- bzw. AIC246-behandelter, AD169-infizierter Zellen quantifiziert.

Virus und Substanz	Analysierte Zellkerne	Kapsid-Typen in %		
		A ^a	B ^b	C ^c
AD169	5	21	41	38
AD169 mit AIC246	5	4	75	21

^aA-Kapside

^bB-Kapside

^cC-Kapside

Ein anderes Bild ergab sich bei der Analyse der AIC2- bzw. AIC3-behandelten Zellen. So führte sowohl die Verabreichung von AIC2 als auch AIC3 zu schwer deformierten, aggregierten, prokapsidartigen Strukturen innerhalb des Zellkerns. Innerhalb dieser aberranten Strukturkomplexe waren *scaffold*-Strukturen deutlich zu erkennen (vgl. Abb. 25, c und d und Abb. 6). Im Gegensatz zur unbehandelten Kontrolle (vgl. Abb. 25 e) waren im Zytoplasma AIC246-, AIC2- bzw. AIC3-behandelter Ansätze keine Viruspartikel zu erkennen (vgl. Abb. 25 f - h). Darüber hinaus war im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in Anwesenheit von AIC246, AIC2 und AIC3 eine stark erhöhte Anzahl an *dense bodies* zu beobachten.

Zusammenfassend zeigen die TEM-Analysen, dass alle AIC-Substanzen einen Prozess im Zellkern inhibieren und - daraus resultierend - der nukleäre *egress* reifer C-Kapside unterbunden wird. Allerdings unterschied sich die antivirale Wirkung von

AIC246 grundlegend von der von AIC2 bzw. AIC3. So führte die Verabreichung von AIC246 zu einer signifikanten Reduktion von 'reifen' C-Kapsiden, was darauf hindeutete, dass AIC246 mit der Prozessierung und Verpackung der viralen genomischen DNA interferiert. Dagegen führte die Verabreichung von AIC2 bzw. AIC3 zu einer Aggregation von Kapsid-Vorläuferstrukturen, was auf einen ähnlichen und zu AIC246 verschiedenen Wirkmechanismus dieser Substanzen hinweist.

C.5 Phäno- und Genotypisierung AIC246-, AIC2- und AIC3-resistenter Viren

C.5.1 Phänotypisierung AIC246-, AIC2- und AIC3-resistenter Viren

Zur Charakterisierung des molekularen Angriffspunkts der AIC-Substanzen wurden bereits vor der Dissertation substanzresistente Viren, entweder mittels einer Ein-Schritt-Selektion oder klassisch durch eine schrittweise Erhöhung der jeweiligen antiviralen Substanz, selektioniert und phänotypisch charakterisiert (23, 69, 117). Die phänotypische Charakterisierung der selektionierten AIC246-resistenten Viren ist in Tabelle 27 und die AIC2- bzw. AIC3-resistenten Viren in Tabelle 28 zusammengefasst.

Tab. 27: Durch AIC246-Inkubation generierte resistente Virusstämme und deren Suszeptibilität gegen AIC246 bzw. GCV

HCMV-Stamm	Klon	EC ₅₀ [µM] ^a				RI ^b
		AIC246		GCV		
AD169	/	0,0056	± 0,0016	3,44	± 1,53	/
AIC246-R-1	13G6ppB12	27	± 3,27	2,40	± 2,54	4821
AIC246-R-2	5C9ppG9	1,24	± 0,38	1,21	± 0,20	221
AIC246-R-3	Mt16H8	1,24	± 0,38	1,21	± 0,20	221
AIC246-R-4	Mt11E11	0,11	± 0,014	4,98	± 0,41	19
AIC246-R-5	Mt1H2	0,11	± 0,014	4,98	± 0,41	19
AIC246-R-6	Mt7E8	0,37	± 0,071	3,98	± 0,93	66
AIC246-R-7	128xEC ₅₀	0,06	± 0,04	1,66	± 0,19	11
AIC246-R-8	Mt6B10	0,13	± 0,0072	4,24	± 1,32	23
AIC246-R-9	mt8	i.B. ^c				
AIC246-R-10	ind 3xFT	27	± 3,27	2,40	± 2,54	4801

^aEC₅₀-Werte wurden mit Hilfe von Plaquereduktionstests ermittelt. Die Daten sind Mittelwerte von mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten und werden mit ihrer Standardabweichung abgebildet.

^bResistenz Index (RI) = EC₅₀ AIC246-resistentes Virus / AIC246-EC₅₀ Wildtyp-Virus

^ci.B.: In Bearbeitung

Die AIC246-Suszeptibilität der resistenten Virusstämme variierte im Vergleich zum Wildtypstamm AD169 von einem elfach bis zu einem 4800-fach erhöhten EC_{50} -Wert, was auf unterschiedliche resistenzvermittelnde Nukleotidsubstitutionen hinweist (vgl. Tab. 27). Bei keinem AIC246-resistenten Virusstamm wurde eine GCV-Kreuzresistenz festgestellt.

Die Analysen der AIC2- bzw. AIC3-resistenten Viren zeigten, dass die in Anwesenheit von AIC2 selektierten Viren entweder eine AIC2 (AIC2-R-1, AIC2-R-2, AIC2-R-6) oder eine AIC2/AIC3-Kreuzresistenz aufwiesen (AIC2-R-5) (vgl. Tab. 28).

Tab. 28: Durch AIC2- bzw. AIC3-Inkubation generierte Virusstämme und deren Suszeptibilität gegen AIC2, AIC3 und GCV

HCMV-Stamm	Klon	EC_{50} [μ M] ^a							
		AIC2		RI ^b	AIC3		RI ^b	GCV	
AD169	/	0,0018	± 0,0008	-	0,0067	± 0,0016	/	3,4	± 1,5
AIC2-R-1	10B8	1,9	± 0,53	1039	0,0022	± 0,0007	/	2,9	± 0,0
AIC2-R-2	2G11	3,23	± 1,62	1768	0,0023	± 0,0009	/	3,6	± 3,0
AIC2-R-3	29C4	n.b. ^c			n.b. ^c			n.b. ^c	
AIC2-R-4	12G4	n.b. ^c			n.b. ^c			n.b. ^c	
AIC2-R-5	9A9	0,0201	± 0,0064	11	0,0974	± 0,0223	15	11	± 4,4
AIC2-R-6	128XEC50	3,23	± 1,62	1768	0,0023	± 0,0009	/	3,6	± 3,0
AIC2-R-7	190/5	n.b. ^c			n.b. ^c			n.b. ^c	
AIC2-R-8	Mt23C5	n.b. ^c			n.b. ^c			n.b. ^c	
AIC2-R-9	Mt4E8	n.b. ^c			n.b. ^c			n.b. ^c	
AIC2-R-10	Mt11E8	n.b. ^c			n.b. ^c			n.b. ^c	
AIC2-R-11	Mt4F8	n.b. ^c			n.b. ^c			n.b. ^c	
AIC2-R-12	32XEC50 116/04	n.b. ^c			n.b. ^c			n.b. ^c	
AIC2-R-13	128XEC50 03/S//19	n.b. ^c			n.b. ^c			n.b. ^c	
AIC3-R-1	9G2	0,0201	± 0,0064	11	0,0974	± 0,0223	15	11	± 4,4
AIC3-R-2	7G4	0,0615	± 0,0198	34	0,6617	± 0,5551	99	3,3	± 2,8
AIC3-R-3	128xIC50	n.b. ^c			n.b. ^c			n.b. ^c	

^a EC_{50} -Werte wurden mit Hilfe von Plaquereduktionstests ermittelt. Die Daten sind Mittelwerte von mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten und werden mit ihrer Standardabweichung abgebildet.

^bResistenz Index (RI) = EC_{50} AIC2/AIC3-resistentes Virus / AIC2/AIC3- EC_{50} Wildtyp-Virus

^cn.b.: Nicht bestimmt

Dagegen wurden in Anwesenheit von AIC3 nur AIC2/AIC3-kreuzresistente Viren selektiert (AIC-3-R-1 und AIC3-R-2). Wie bei AIC246-resistenten Viren wurde bei keinem der durch AIC2- bzw. AIC3-Behandlung generierten Viren eine

Kreuzresistenz zu GCV festgestellt. Die beobachtete AIC2/AIC3-Kreuzresistenz bestärkt die Vermutung aus den vorangegangenen Experimenten, dass diese beiden Substanzen, obwohl chemisch verschieden, ihren inhibitorischen Effekt über einen vergleichbaren Wirkmechanismus vermitteln (vgl. Tab. 28).

C.5.2 Genotypisierung AIC246-, AIC2- und AIC3-resistenter Viren

Um die potentiellen viralen Zielproteine der AIC-Substanzen zu identifizieren, wurden in einem nächsten Schritt die resistenten Virusmutanten einer Sequenzanalyse unterzogen.

C.5.2.1 AIC246-resistente Viren

Die vorherigen Experimente führten zu der Vermutung, dass AIC246 in der späten Phase des viralen Replikationszyklus seine antivirale Aktivität induziert. Da AIC246 in *Time-of-Addition-Experimenten* eine vergleichbare Kinetik zu dem Terminaseinhibitor Bay 38-4766 zeigte, lag es nahe, einen vergleichbaren inhibitorischen Wirkmechanismus beider Substanzen zu vermuten (45, 178). In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Bay 38-4766 mit dem viralen Terminasekomplex und damit mit der Prozessierung und Verpackung der viralen genomischen DNA interferiert (45, 244). Bay 38-4766 resistenzvermittelnde Mutationen wurden in den Genen des viralen Terminasekomplexes, bestehend aus der großen (pUL56) und kleinen (pUL89) Untereinheit, identifiziert (45). Zusätzlich wurden Mutationen im ORF des Portal-Proteins UL104 beschrieben, welche jedoch zu keiner Bay 38-4766-Resistenz führten (45). Für die Verpackung der viralen genomischen DNA ist sowohl der pUL56/pUL89 Terminase- als auch der Portal-Proteinkomplex von essentieller Bedeutung. Um zu überprüfen, ob AIC246 ebenfalls mit dem viralen Terminasekomplex interferiert, wurden daher bei AIC246-resistenten Virusstämmen die offenen Leserahmen von UL56, UL89 und UL104 sequenziert (vgl. Tab. 29 und A.1.5.4) (45, 244).

Tab. 29: Genotypen der generierten AIC246-resistenten Viren

Bezeichnung	Klon	UL56 ^a	UL56 ^a	UL89 ^b	UL89 ^b	UL104 ^c
		DNA	AS ^d	DNA	AS ^d	DNA
AIC246-R-1	13G6ppB12	g974a	C325Y	/	/	c1887g ^f
AIC246-R-2	5C9ppG9	t723c	L241P	t1033g ^e	S345A	c1887g ^f
AIC246-R-3	Mt16H8	t723c	L241P	t1033g ^e	S345A	/
AIC246-R-4	Mt11E11	g1106t	R369M	/	/	c1887g ^f
AIC246-R-5	Mt1H2	g1106t	R369M	t1033g ^e	S345A	c1887g ^f
AIC246-R-6	Mt7E8	g1107c	R369S	t1033g ^e	S345A	/
AIC246-R-7	128XEC50	a1105g	R369G	t1033g ^e	S345A	c1887g ^f
AIC246-R-8	Mt6B10	g691c	V231L	t1033g ^e	S345A	c1887g ^f
AIC246-R-9	mt8	a694g	N232D	/	/	/
AIC246-R-10	ind 3xFT	g974a	C325Y	t1033g ^e	S345A	/

^aGroße Terminaseuntereinheit

^bKleine Terminaseuntereinheit

^cPortal-Protein

^dAminosäure

^eNicht mit der Substanz-Resistenz verbundene HCMV-AD169-Interstrang Variation

^fStille Mutation

Die Ergebnisse (zusammengefasst in Tabelle 29) zeigen, dass nur innerhalb des ORF der großen Terminaseuntereinheit UL56 Sequenzpolymorphismen auf Aminosäure-Ebene detektiert wurden und bestärken die Annahme, dass AIC246 mit der viralen Terminase-Aktivität interferiert. Je zwei Virusstämme wiesen identische Aminosäuresubstitutionen auf (AIC246-R-1, AIC246-R-10, AS: C325Y; AIC246-R-2, AIC246-R-3, AS: L241P) (vgl. Tab. 29). Bei vier Virusstämmen wurden jedoch drei voneinander abweichende Aminosäuresubstitutionen an derselben Position innerhalb des ORF festgestellt (AIC246-R-4 und AIC246-R-5, AS: R369M; AIC246-R-6, AS: R369S; AIC246-R-7, AS: R369G). Bei zwei weiteren Virusstämmen wurden weitere singuläre Aminosäuresubstitutionen detektiert (AIC246-R-8, AS: V231L; AIC246-R-9, AS: N232D). Die Sequenzanalyse der kleinen Terminaseuntereinheit pUL89 sowie des Portal-Proteins pUL104 ergab für keinen AIC246-resistenten Virusstamm eine zu AD169 abweichende DNA-Sequenz. Hier wurden nur bereits bekannte Interstrangvariationen festgestellt (vgl. Tab. 29) (45).

C.5.2.2 AIC2- bzw. AIC3-resistente Viren

Die AIC2- bzw. AIC3-induzierten intranukleären Inklusionen der L-Strukturproteine MCP und SCP führten, in Verbindung mit den in der TEM-Analyse beobachteten aberranten Kapsidstrukturen zu der Vermutung, dass AIC2 bzw. AIC3 die Assemblierung des Nukleokapsids beeinflussen (vgl. C.3 und C.4). Daher wurden bei

den AIC2- bzw. AIC3-resistenten Virusstämmen die offenen Leserahmen der an der Kapsidassemblierung beteiligten L-Strukturproteine UL86 (*major capsid protein*, MCP), UL85 (*minor capsid protein*, mCP), UL48/49 (*small capsid protein*, SCP), UL46 (*minor capsid binding protein*, mCP-BP) und UL77 (putatives *portal-capping protein*, PCP) Cap-Protein) sequenziert, um potentiell resistenzvermittelnde Mutationen zu entdecken (vgl. Tab. 30).

Tab. 30: Genotypen der generierten AIC2- bzw. AIC3-resistenten Viren

Bezeichnung	Klon	UL86 ^a		UL85 ^b	UL48/49 ^c	UL46 ^d	UL77 ^e
		DNA	AA				
AIC2-R-1	10B8	g3944a	C1315Y	/	/	/	/
AIC2-R-2	2G11	g3944a	C1315Y	/	/	/	/
AIC2-R-3	29C4	g1687a	D563N	/	/	/	/
AIC2-R-4	12G4	g3561t	K1187N	/	/	/	/
AIC2-R-5	9A9	g1574a	G525D	/	/	/	/
AIC2-R-6	128XEC50	g3944a	C1315Y	/	/	/	/
AIC2-R-7	190/5	a1565g a4012g	Y522C K1338E	/	/	/	/
AIC2-R-8	Mt23C5	t3552a	N1184K	/	/	/	/
AIC2-R-9	Mt4E8	g1748t	R583L	/	/	/	/
AIC2-R-10	Mt11E8	a4012g	K1338N	/	/	/	/
AIC2-R-11	Mt4F8	g1748t	R583L	/	/	/	/
AIC2-R-12	32XEC50 116/04	c1307a	A436D	/	/	/	/
AIC2-R-13	128XEC50 03/S//19	g1702c; gc3593/94ta	D444N G568R; C1198L	/	/	/	/
AIC3-R-1	9G2	g1574a	G525D	/	/	/	/
AIC3-R-2	7G4	c3675a	F1225L	/	/	/	/
AIC3-R-3	128XIC50 116/04	c2003a	P668Q	/	/	/	/

^aMajor capsid protein, MCP

^bMinor capsid protein, mCP

^cSmall capsid protein, SCP

^dMinor capsid binding protein, mCP-BP

^ePutatives portal-capping protein, PCP

Überraschend zeigte die Sequenzanalyse der AIC2-resistenten, AIC3-resistenten bzw. AIC2/AIC3-kreuzresistenten Virusstämmen, dass alle ausschließlich innerhalb des ORF des *major capsid proteins* UL86-Aminosäuresubstitutionen aufweisen (vgl. Tab. 30). Bei insgesamt 13 sequenzierten AIC2-resistenten Virusstämmen wurden acht Virusstämmen mit singulären Aminosäuresubstitutionen detektiert, wovon eine dreifach vertreten ist (AIC2-R1, AIC2-R2 und AIC2-R6; AS: C1315Y). Zusätzlich wurden zwei Virusstämmen mit multiplen Aminosäuresubstitutionen (AIC2-R-7, AS: Y522C, K1138E; AIC2-R-13, AS: D444N, G568R, C1198L) sowie eine potentiell

AIC2/AIC3-Kreuzresistenz vermittelnde Aminosäuresubstitution detektiert (AIC2-R-5, AIC-3-R-11; AS: G525D) (vgl. Tab. 30).

Die Sequenzanalyse der AIC3-resistenten Virusstämme führte zu der Detektion von drei verschiedenen singulären Aminosäuresubstitutionen, wovon zwei potentiell eine AIC2/AIC3-Kreuzresistenz vermittelten (AIC2-R-5/AIC3-R-1, AS: G525D; AIC3-R-2, AS: F1225L) (vgl. Tab. 30).

C.6 Markertransfer-Analysen

Um zu überprüfen, ob die detektierten UL56- bzw. UL86-Aminosäuresubstitutionen tatsächlich eine AIC246, AIC2- bzw. AIC3-Resistenz vermitteln, wurden Markertransfer-Analysen durchgeführt. Hierfür wurde im Rahmen der Dissertation die *En-passant*-Mutagenese (Tischer et al., 2006) etabliert, welche eine markerlose Insertion von DNA-Fragmenten in das HCMV-Genom ermöglicht (vgl. B.2.3.4) (308, 342).

Um eine Substanz-Suszeptibilitäts-Analyse der neu generierten, rekombinanten Viren mit Hilfe von Fluoreszenz-Reduktionsexperimenten zu ermöglichen, wurde als Ausgangs-Bacmid das Bacmid pHG verwendet (freundlicherweise von Eva Borst und Martin Messerle, Medizinische Hochschule Hannover, zur Verfügung gestellt) (117, 178). pHG wurde aus dem für den Laborstamm AD169 kodierenden HCMV-Bacmid HB5 generiert (35). Dabei wurde in die U_S -Region eine CMV *major immediate-early promoter* (MIEP) regulierte EGFP-exprimierende Expressionskassette stabil integriert (34). Das so exprimierte Fluoreszenzprotein diente in den Fluoreszenz-Reduktionsexperimenten als Reporterprotein.

C.6.1 Die Methodik der *En-passant*-Mutagenese am Beispiel der Generierung der rekombinanten Virusmutante RV-HG-UL56-R369S

Da die Etablierung der *En-passant*-Mutagenese ein zentraler Bestandteil dieser Arbeit ist, wird hier am Beispiel der Konstruktion der rekombinanten Virusmutante RV-HG-UL56-R369S diese Methode im Detail beschrieben (vgl. B.2.3.4) (307, 308).

Zu Beginn wurde das Ausgangs-Bacmid pHG in *E. coli* GS1783 elektroporiert. *E. coli* GS1783 kodiert sowohl für die Rekombinasen des Red-Rekombinationssystems, deren Expression durch einen Hitze-Schock-Promotor reguliert wird, als auch für die Homingendonuklease *I-Sce I*, deren Expression durch einen Arabinose-

induzierbaren Promotor gesteuert wird (307, 308). Nach der Elektroporation wurde die Integrität des Bacmids analysiert. Hierfür wurde die Bacmid-DNA isoliert und mittels einer RFLP-Analyse untersucht. Derjenige Klon, dessen Restriktionsmuster mit den *in silico* generierten pHG-Restriktionskarten (Vector NTI, Invitrogen) übereinstimmte, wurde als pHG *E. coli* GS1783 bezeichnet und für die nachfolgenden *En-passant*-Mutagenesen verwendet (vgl. Abb. 26).

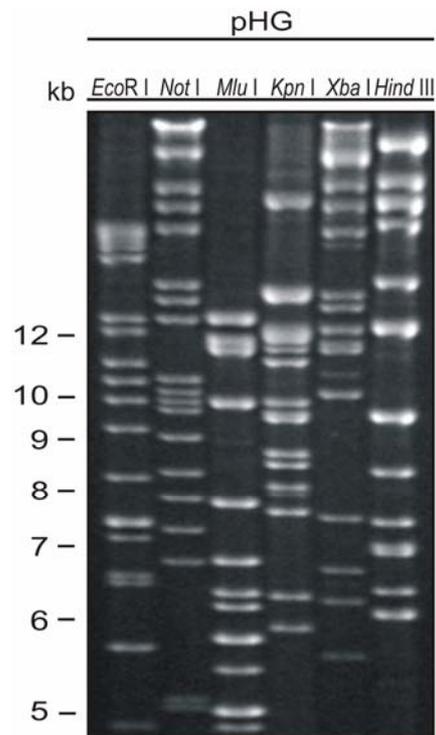


Abb. 26: Restriktionsanalyse der Bacmid-DNA aus *E. coli* pHG-GS1783

Restriktionsanalyse der gereinigten Bacmid-DNA des finalen Klons *E. coli* pHG-GS1783 mit *EcoR* I, *Not* I, *Mlu* I, *Kpn* I, *Xba* I bzw. *Hind* III. Die Restriktionsansätze wurden über ein 0,8%iges Agarosegel getrennt. kb: Kilobasen.

Für die Generierung der pHG-UL56-R369S-Mutante wurde zunächst mittels PCR-Amplifikation eine die Punktmutation beinhaltende Rekombinationskassette generiert (vgl. B.2.3.4.1 und Tab. 9). Das gereinigte Amplikon wurde in elektro- und rekombinationskompetente *E. coli* pHG GS1783 elektroporiert und mit Hilfe der Red-Rekombinasen in das Bacmid pHG basengenau integriert (1 Red-Rekombination) (vgl. B.2.3.4). Zur Verifizierung der Integration der Rekombinationskassette wurde nachfolgend eine Kolonie-PCR mit UL56-spezifischen Primern, die 5' und 3' der Integrationsstelle der Rekombinationskassette binden, durchgeführt. Ein um die

Rekombinationskassette (1035 bp) vergrößertes Amplikon deutet dabei auf eine erfolgreiche Integration der Rekombinationskassette in die UL56-Zielsequenz hin (vgl. Abb. 27).

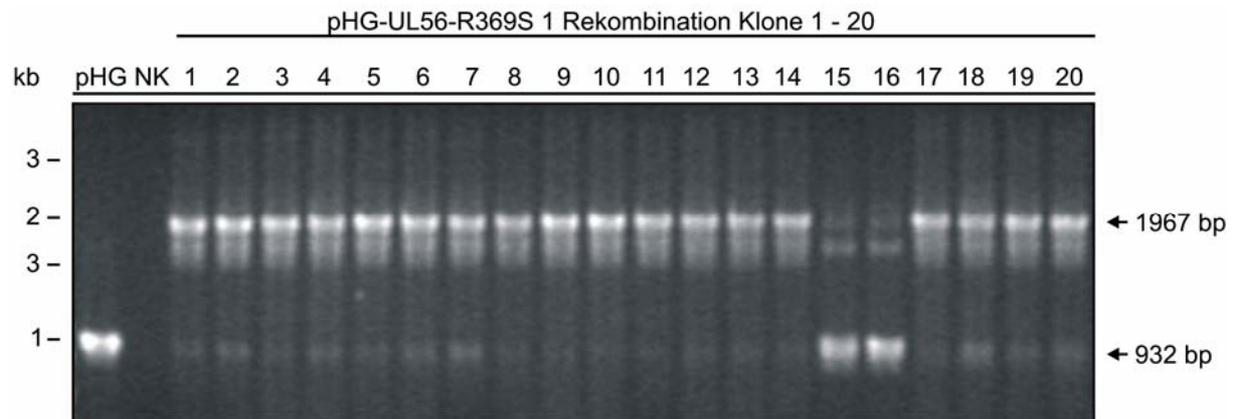


Abb. 27: HCMV-UL56-R369S-Nukleotidsubstitution: Kolonie-PCR zur Überprüfung der ersten Red-Rekombination der pHG-UL56-R369S-Integrierten

Die Kolonie-PCR wurde mit UL56-spezifischen Primern, die 5' und 3' der Integrationsstelle der Rekombinationskassette binden, durchgeführt. Die PCR-Amplifikate wurden mittels eines Agarosegels aufgetrennt. Für das Wildtyp-Amplikon wurde eine Größe von 932 bp und für die Rekombinanten eine Größe von 1967 bp erwartet. Die Bacmid-DNA der Klone 8, 11, 14, 17 und 19 wurde jeweils für die RFLP-Analyse verwendet. kb: Kilobasen; bp: Basenpaar; NK: Negativkontrolle.

Zusätzlich zu der Kolonie-PCR wurden RFLP-Analysen von ausgewählten Klonen durchgeführt. Hierbei deutet ein zu den *in silico* generierten Restriktionskarten analoges Restriktionsmuster der Red-Rekombinanten auf eine erfolgreiche, erste Rekombination hin (vgl. Abb. 28).

Generell wurden im Rahmen der *En-passant*-Mutagenese vier bis sechs Klone der Kolonie-PCR der ersten (vgl. Abb. 28, Spur 2 - 6) bzw. zweiten (vgl. Abb. 30, Spur 4 - 7) Red-Rekombination selektioniert. Deren Bacmid-DNA wurde isoliert und, wie in Abbildung 28 dargestellt, mit Hilfe von mindestens drei RFLP-Analysen charakterisiert.

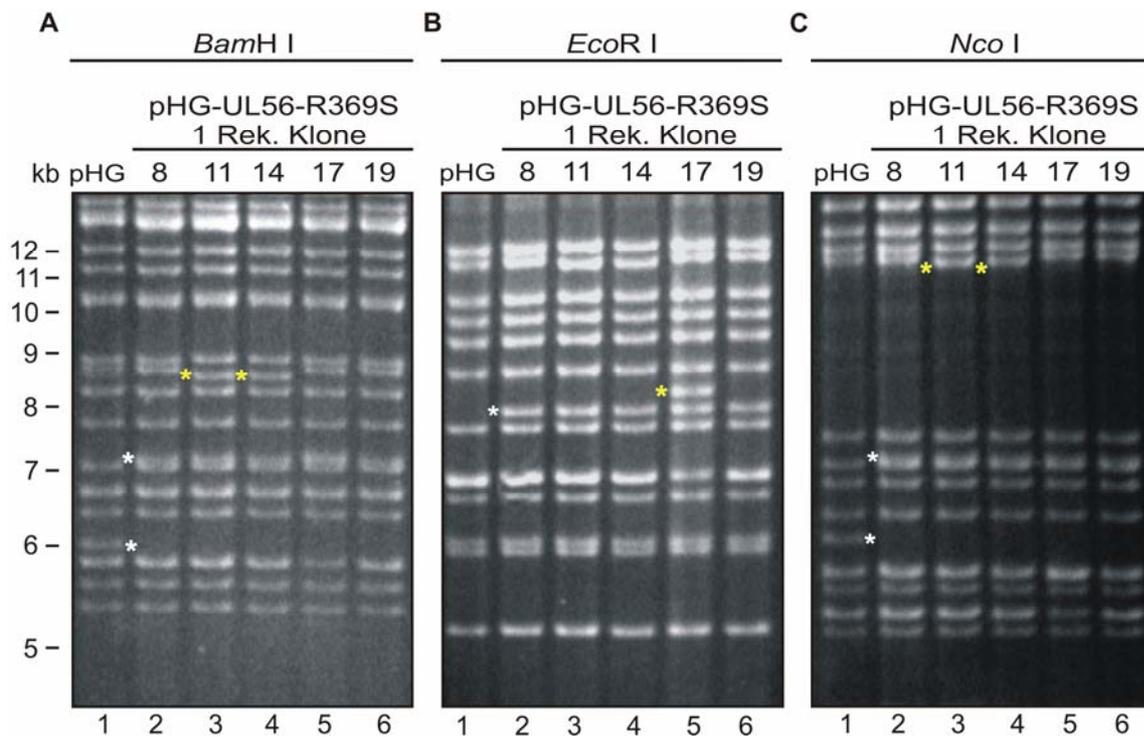


Abb. 28: HCMV-UL56-R369S-Nukleotidsubstitution: RFLP-Analyse zur Überprüfung der ersten Red-Rekombination der pHG-UL56-R369S-Integrierten

Die Bacmid-DNA der selektierten Klone 8, 11, 14, 17 und 19 der pHG-UL56-R369S-Integrierten (Spur 2 - 6) wurde isoliert und einer RFLP-Analyse jeweils mit *BamH* I (**A**), *EcoR* I (**B**) bzw. *Nco* I (**C**) im Vergleich zur ebenso geschnittenen Bacmid-DNA des Wildtyps (pHG, A, B, und C jeweils Spur 1) unterzogen. Die Restriktionsansätze wurden über ein 0,8%iges Agarosegel getrennt. Die durch die erste Rekombination veränderten Restriktionsbanden sind jeweils mit einem weißen Stern gekennzeichnet (vgl. Spur 1 und 2). Die Restriktionsmuster der Klone 11, 14 (vgl. A, Spur 3 und 4) und 17 (vgl. B, Spur 5) entsprachen nicht dem *in silico* generierten Restriktionsmuster der pHG-UL56-R369S-Integrierten. Die aberranten Banden sind mit einem gelben Stern gekennzeichnet (vgl. A, Spur 3 und B, Spur 5). Klone 8 und 19 (Spur 2 und 6) wurden für die zweite Red-Rekombination verwendet. kb: Kilobasen; Rek.: Rekombination.

Die zweite Red-Rekombination wurde anschließend mit den unabhängig voneinander generierten Klonen 8 und 19 der ersten Red-Rekombination durchgeführt (vgl. Abb. 28 Spur 2 und 6). Mit Hilfe einer klassischen Replikaplattierung wurden nachfolgend die kanamycinsensitiven Klone (Verlust der Rekombinationskassette) selektiert und durch Kolonie-PCR und RFLP-Analyse auf den Verlust der Rekombinationskassette - und damit auf den Verlust des 1967 bp großen Amplikons - hin überprüft (vgl. Abb. 29 und 30). Nachfolgend wurden zwei positive, unabhängig voneinander generierte Klone in ihrem rekombinanten Sequenzbereich mittels Sequenzierung analysiert (GATC Biotech, Konstanz).

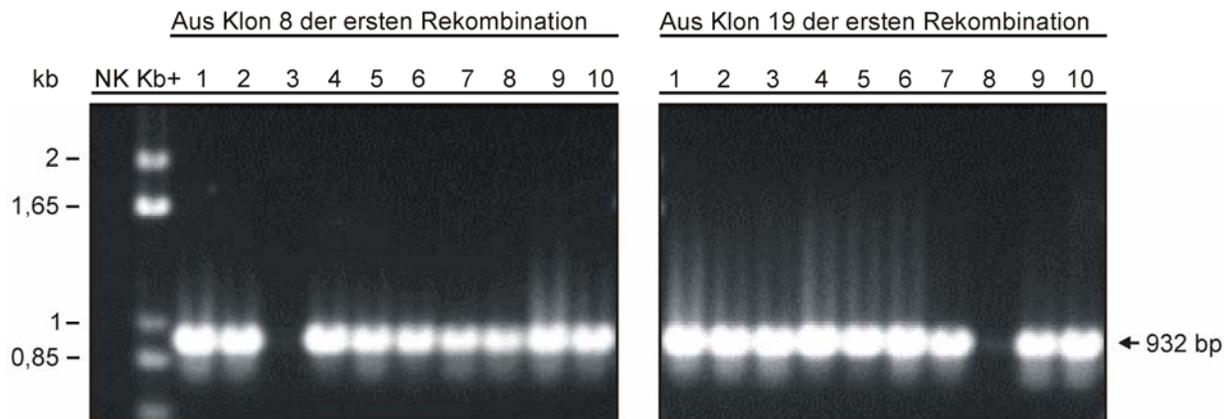


Abb. 29: HCMV-UL56-R369S-Nukleotidsubstitution: Kolonie-PCR zur Analyse der zweiten Red-Rekombination

Die Kolonie-PCR wurde mit UL56-spezifischen Primern, die 5' und 3' der Integrationsstelle der Rekombinationskassette binden, durchgeführt. Die PCR-Amplifikate wurden anschließend über ein Agarosegel getrennt. Für das Amplikon der zweiten Red-Rekombination wurde eine Größe von 932 bp erwartet. Bis auf die Klone 8/3 und 19/8, bei denen die PCR-Amplifizierung nicht erfolgreich verlief, weisen alle Klone die korrekte Amplikongröße auf. Die Bacmid-DNA der Klone 8/1, 8/2, 19/9 und 19/10 wurde jeweils für die nachfolgende RFLP-Analyse verwendet. kb: Kilobasen; bp: Basenpaar; NK: Negativkontrolle.

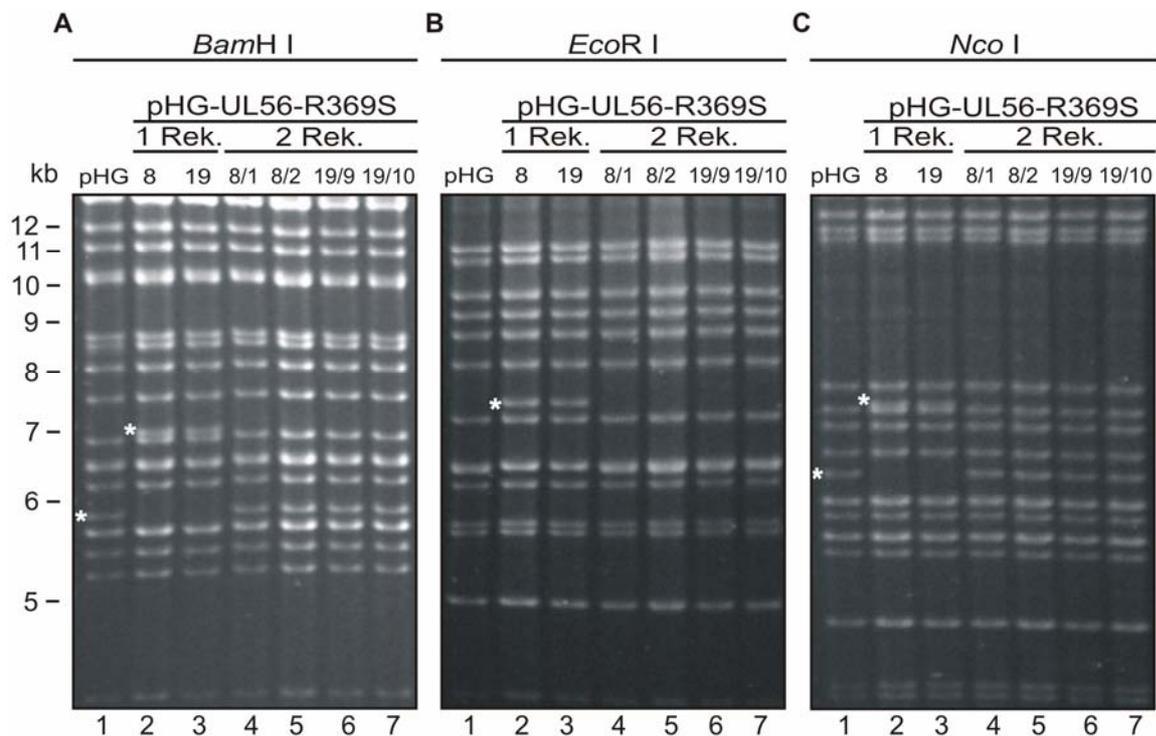


Abb. 30: HCMV-UL56-R369S-Nukleotidsubstitution: RFLP-Analyse zur Überprüfung der Rekombinanten der zweiten Red-Rekombination

Abb. 30: Fortgesetzt

Die Bacmid-DNA der Klone 8/1, 8/2, 19/9 und 19/10 (Spur 4 - 7) wurde jeweils mit *Bam*H I (A), *Eco*R I (B) bzw. *Nco* I (C) geschnitten und mit der ebenso geschnittenen Bacmid-DNA des Wildtyps (pHG, A, B und C jeweils Spur 1) sowie den parental Klonen der ersten Rekombination (A, B und C jeweils Spur 2 und 3) über ein 0,8%iges Agarosegel getrennt. Die Restriktionsmuster wurden anschließend anhand von *in silico* generierten Restriktionskarten analysiert. Die Restriktionsmuster der Klone 8/1, 8/2, 19/9 und 19/10 (Spur 4 - 7) entsprachen dem Restriktionsmuster der Wildtyp Bacmid-DNA, was auf den Verlust der Rekombinationskassette hinweist. Die durch die erste Red-Rekombination veränderten Restriktionsbanden sind entsprechend mit einem Stern gekennzeichnet. kb: Kilobasen; Rek.: Rekombination.

Im Anschluss an die *En-passant*-Mutagenese wurden MRC-5-Zellen mit den entsprechenden Bacmiden transfiziert und die jeweiligen rekombinanten Viren rekonstituiert (vgl. B.2.2.2).

C.6.2 Zusammenfassung aller durch *En-passant*-Mutagenese generierter Virusmutanten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mittels Markertransfer-Analyse drei putative AIC246- und fünf AIC2- bzw. AIC3-Resistenzmutationen auf ihre jeweilige resistenzvermittelnde Eigenschaft hin analysiert. Zu diesem Zweck wurden mit Hilfe der *En-passant*-Mutagenese die in Tabelle 31 aufgeführten rekombinanten UL56- bzw. UL86-Virusmutanten erzeugt.

Tab. 31: Mittels Markertransfer generierte rekombinante UL56- bzw. UL86-Virusmutanten

Rekombinante Virusmutanten	ORF ^a	Mutation		MT ^b
		DNA	AS ^c	Ja / Nein
RV-HG-UL56-L241P	UL56	t722c	L241P	Ja
RV-HG-UL56-C325Y	UL56	g974a	C325Y	Ja
RV-HG-UL56-R369S	UL56	g1107c	R369S	Ja
RV-HG-UL86-A436D	UL86	c1307a	A436D	Ja
RV-HG-UL86-G525D	UL86	g1574a	G525D	Ja
RV-HG-UL86-R583L	UL86	g1748t	R583L	Ja
RV-HG-UL86-R583L-Rev. ^d	UL86	t1748g	L583R	Ja
RV-HG-UL86-C1315Y	UL86	g3944a	C1315Y	Ja
RV-HG-UL86-C1315Y-Rev. ^d	UL86	a3944g	Y1315C	Ja
RV-HG-UL86-F1225L	UL86	c3675a	F1225L	Ja

^aORF: *Open reading frame*

^bMT: Markertransfer

^cAS: Aminosäure

^dRev.: Revertante

Bisher nicht durch Markertransfer analysierte UL56- bzw. UL86-Aminosäuresubstitutionen (vgl. Tab: 29 - 30):

UL56 (AS): V231L, N232D, R369M, R369S

UL86 (AS): D444N, Y522C, D563N, G568R, N1184K, K1187N, C1198L, K1338E, K1338N

Für die Generierung AIC246-resistenter, rekombinanter Viren wurden mittels *En-passant*-Mutagenese drei putativ AIC246-Resistenz vermittelnde Punktmutationen (nt: t722c, AS: L241P; nt: g974a, AS: C325Y; nt: g1107c, AS: R369S) *unabhängig voneinander* in den UL56-ORF des Wildtyp-Bacmids pHG inseriert. Aus den erzeugten Bacmiden pHG-UL56-L241P, pHG-UL56-C325Y und pHG-UL56-R369S wurden die entsprechenden rekombinanten Viren rekonstituiert (vgl. Tab. 31 und Abb. 31).

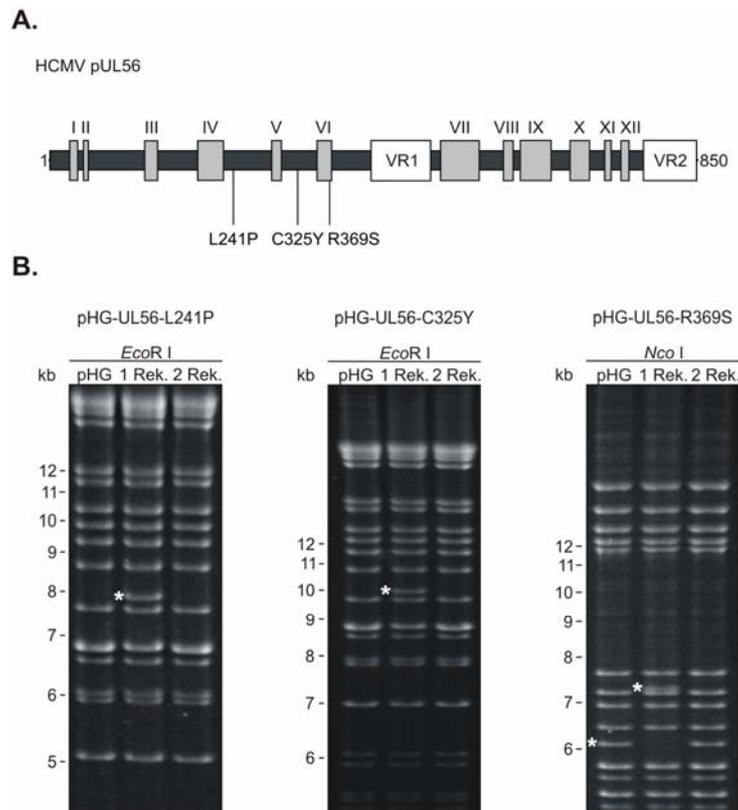


Abb. 31: Insertion von potentiell AIC246-Resistenz vermittelnden Nukleotidsubstitutionen in den UL56-Leserahmen

(A) Schematische Darstellung der pUL56-Domänenstruktur. Die bei Herpesviren hoch konservierten Regionen (I – XII) sind grau unterlegt. Die bei HCMV vorhandenen variablen Domänen sind weiß unterlegt (VR1, VR2). Die Position der unabhängig voneinander inserierten Nukleotidsubstitutionen t722c (AS: L241P), g974a (AS: C325Y) bzw. g1107c (AS: R369S) ist entsprechend markiert. Verändert nach (51)

(B) RFLP-Analyse des pHG-UL56-L241P-, pHG-UL56-C325Y- bzw. pHG-UL56-R369S-Markertransfers. Die jeweilige Bacmid-DNA wurde mit *EcoR* I (pHG-UL56-L241P, pHG-UL56-C325Y) bzw. *Nco* I (pHG-UL56-R369S) geschnitten und über ein 0,8%iges Agarosegel getrennt. Die durch die erste Red-Rekombination veränderten Restriktionsbanden sind mit einem Stern gekennzeichnet. 1 Rek.: Intermediat der ersten Rekombination; 2 Rek.: Rekombinantes Bacmid der zweiten Rekombination; kb: Kilobasen.

Für die Erzeugung AIC2- bzw. AIC3-resistenter rekombinanter Viren wurden drei putativ AIC2-Resistenz vermittelnde Punktmutationen (nt: g3944a, AS: C1315Y; nt: c1307a, AS: A436D; nt: g1748t, AS: R583L) sowie zwei putativ AIC2/AIC3-Kreuzresistenz vermittelnde Punktmutationen (nt: g1574a; AS: G525D und nt: c3675a, AS: F1225L) *unabhängig voneinander* jeweils in den UL86-ORF des Wildtyp-Bacmids pHG inseriert. Aus den generierten Bacmiden pHG-UL86-C1315Y, pHG-UL86-A436D, pHG-UL86-G525D sowie pHG-UL86-F1225L wurden die entsprechenden Rekombinanten rekonstituiert (vgl. Tab. 31 und Abb. 32).

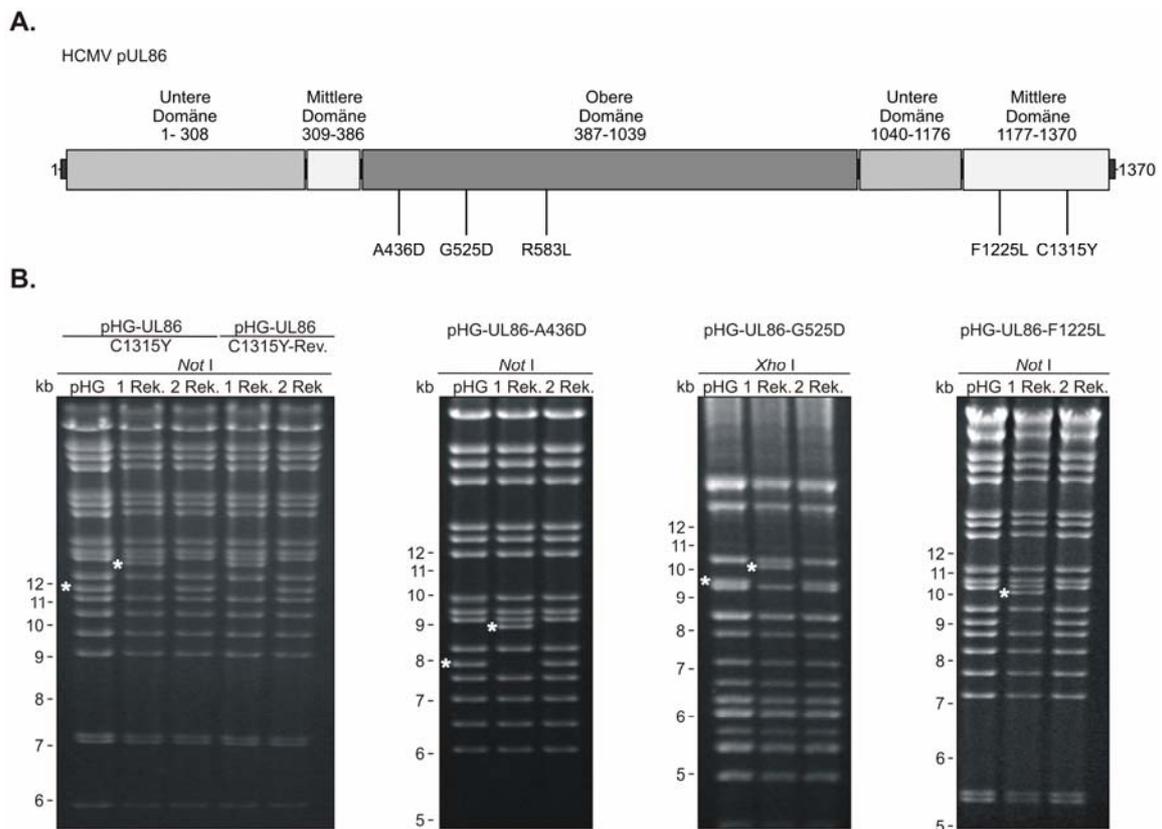


Abb. 32: Insertion von potentiell AIC2- bzw. AIC3-Resistenz vermittelnden Nukleotidsubstitutionen in den UL86-Leserahmen

(A) Schematische Darstellung der pUL86-Domänenstruktur. Das HCMV *major capsid protein* wird in eine untere, mittlere und obere Domäne unterteilt. Die Positionen der unabhängig voneinander inserierten Nukleotidsubstitutionen c1307a (AS: A436D), g1574a (AS: G525D), g1748t (AS: R583L), c3675a (AS: F1225L) und g3944a (AS: C1315Y) sind entsprechend markiert. Für die Nukleotidsubstitutionen g1748t und g3944a wurden zusätzlich die entsprechenden Revertanten t1748g (AS: L583R) bzw. a3944g (AS: Y1315C) konstruiert. Verändert nach (9, 38)

Abb. 32: Fortgesetzt

(B) RFLP-Analyse des pHG-UL86-A436D-, pHG-UL86-G525D-, pHG-UL86-F1225L-, pHG-UL86-C1315Y- und pHG-UL86-C1315Y-Rev.-Markertransfers. Die Bacmid-DNA wurde mit *Not* I (pHG-UL86-A436D, pHG-UL86-F1225L, pHG-UL86-C1315Y und pHG-UL86-C1315Y-Rev.) bzw. *Xho* I (pHG-UL86-G525D) geschnitten und über ein 0,8%iges Agarosegel getrennt. Die durch die Insertion der Rekombinationskassette veränderten Restriktionsbanden sind entsprechend mit einem Stern gekennzeichnet. 1 Rek.: Intermediat der ersten Rekombination; 2 Rek.: Rekombinantes Bacmid der zweiten Rekombination; kb: Kilobasen.

Dabei stellte sich heraus, dass sich aus dem rekombinanten Bacmid pHG-UL86-R583L kein replikationsfähiges Virus rekonstituieren ließ. Diese Beobachtung wird im Folgenden gesondert behandelt (siehe C.6.4.2 und C.7).

Um zu prüfen, ob die *En-passant*-Mutagenese zu unerwarteten Mutationen (*off site effects*) führte, wurden zusätzlich zwei rekombinante Bacmide (pHG-UL86-C1315Y und pHG-UL86-R583L) zum Wildtyp rückmutiert (Revertante) und das entsprechende Virus rekonstituiert (RV-HG-UL86-C1315Y-Rev., RV-HG-UL86-R583L-Rev.) (vgl. Tab. 31 sowie Abb. 32 und 35).

C.6.3 Einfluss der inserierten Punktmutationen auf die Virusreplikation

Um zu untersuchen, ob die inserierten Punktmutationen das Wachstumsverhalten der jeweiligen Viren in Zellkultur beeinflussen, wurde das Replikationsverhalten der rekonstituierten Viren anhand von Wachstumskurven untersucht. Hierfür wurden NHDF-Zellen mit RV-HG, den UL56-rekombinanten Viren (RV-HG-UL56-L241P, RV-HG-UL56-C325Y, RV-HG-UL56-R369S) bzw. den UL86-rekombinanten Viren (RV-HG-UL86-C1315Y, RV-HG-UL86-C1315Y-Rev., RV-HG-UL86-A436D, RV-HG-UL86-G525D, RV-HG-UL86-F1225L) mit einer MOI von 0,1 infiziert. In definierten Zeitabständen (2, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 und 192 Stunden nach Infektion) wurden die Zellkulturüberstände der infizierten Kulturen gewonnen und die Titer der rekombinanten UL56- bzw. UL86-Virusmutanten bestimmt (vgl. Abb. 33).

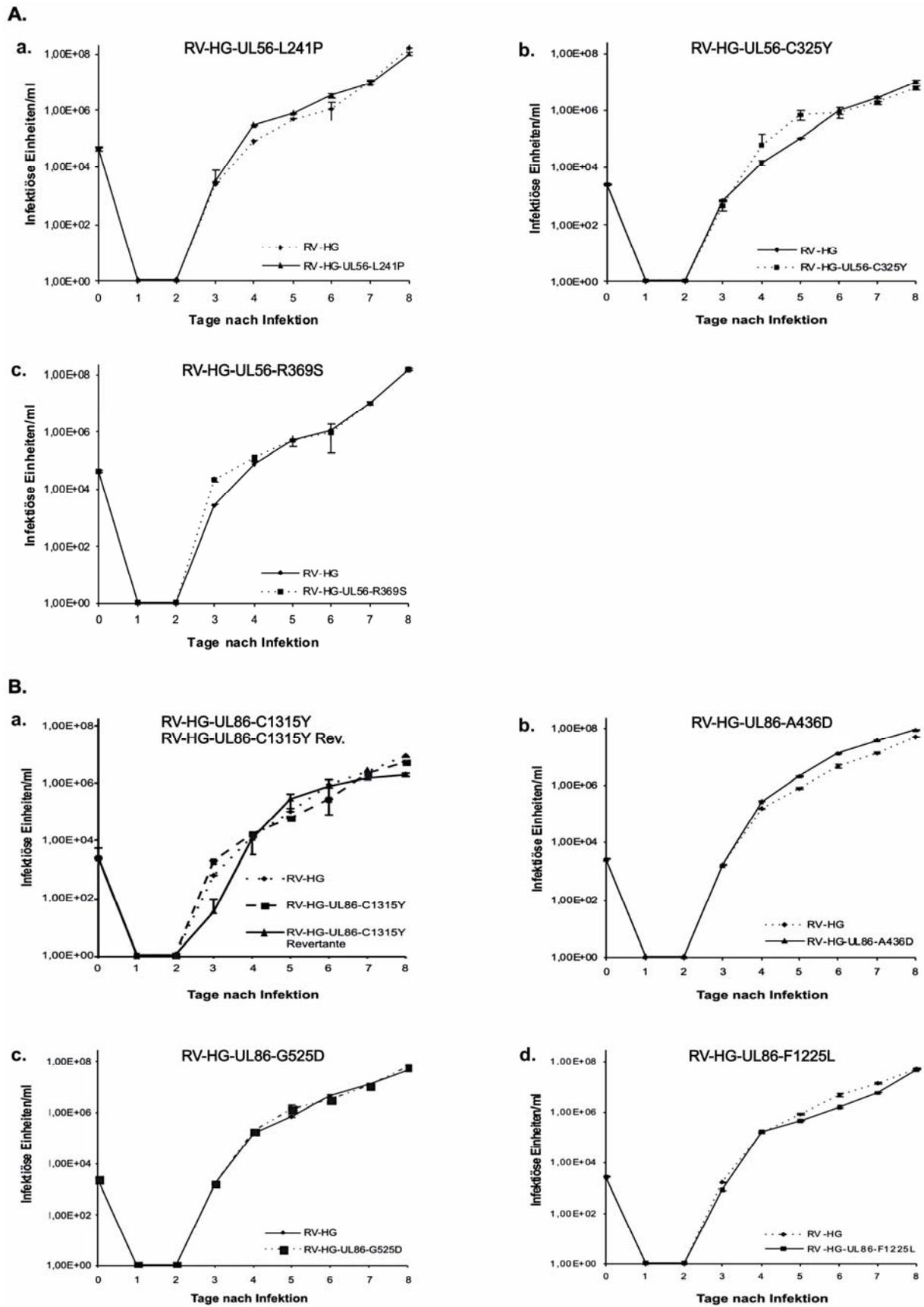


Abb. 33: Mehrschritt-Wachstumskinetik der rekombinanten UL56- (A) bzw. UL86-Virusmutanten (B)

Abb. 33: Fortgesetzt

NHDF-Zellen wurden mit RV-HG (**A und B**), RV-HG-UL56-L241P (**A, a**), RV-HG-UL56-C325Y (**A, b**), RV-HG-UL56-R369S (**A, c**) bzw. RV-HG-UL86-C1315Y, RV-HG-UL86-C1315Y-Rev. (**B, a**), RV-HG-UL86-A436D (**B, b**), RV-HG-UL86-G525D (**B, c**) sowie RV-HG-UL86-F1225L (**B, d**) infiziert (MOI 0,1). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde der Zellkulturüberstand gewonnen. Die Bestimmung der Virustiter erfolgte mittels IE1-Detektion (vgl. B.2.2.4). Die Standardabweichungen resultieren aus der entsprechenden Dreifachbestimmung.

Die Auswertung der Wachstumskurven ergab, dass - mit Ausnahme der replikationsdefizienten Virusmutante RV-HG-UL86-R583L - alle rekombinanten UL56- und UL86-Virusmutanten eine Wachstumskinetik zeigten, die der Kinetik des Wildtyp-Virus RV-HG entsprach. Daher wird geschlossen, dass keine der untersuchten putativ resistenzvermittelnden Mutationen die Virusreplikation in Zellkultur beeinträchtigt.

C.6.4 Suszeptibilitäts-Analysen der generierten Virusmutanten

Um zu überprüfen, ob die via Markertransfer inserierten UL56- bzw. UL86-Nukleotidsubstitutionen tatsächlich eine AIC246-, AIC2- bzw. AIC3-Resistenz vermitteln, wurden die EC_{50} -Werte der rekombinanten Viren mit Hilfe von Fluoreszenzreduktions-Experimenten ermittelt (vgl. B.2.2.6).

C.6.4.1 Rekombinante UL56-Virusmutanten

Die in Tabelle 32 zusammengefassten Suszeptibilitäts-Analysen der rekombinanten UL56-Virusmutanten ergaben, dass alle eingeführten Mutationen eine AIC246-Resistenz vermitteln können. Die Größenordnung der Resistenzen ist hierbei mit der der selektionierten parental Virusstämme vergleichbar (vgl. Tab. 27 und 32). So weist RV-HG-UL56-L241P eine 252-fach, RV-HG-UL56-R369S eine 56-fach und RV-HG-UL56-C325Y eine 11.000-fach erhöhte AIC246-Resistenz auf (vgl. Tab. 32).

Tab. 32: Suszeptibilität der UL56-mutierten rekombinanten Viren im Vergleich zu RV-HG gegen AIC246, AIC2, AIC3 sowie den zugelassenen Polymeraseinhibitor GCV und die Terminaseinhibitoren Bay 38-4766 und BDCRB

	EC ₅₀ ^a [µM]							
	RV-HG (HCMV wt)	RI ^b	RV-HG UL56-L241P ^c	RI ^b	RV-HG UL56-R369S ^c	RI ^b	RV-HG UL56-C325Y ^{cd}	RI ^b
AIC246	0,0024 ± 0,0008	/	0,6058 ± 0,2221	252	0,1367 ± 0,0656	56	26,4 ± 6,5	11000
AIC2	0,0014 ± 0,0004	/	0,0019 ± 0,0011	/	0,0014 ± 0,0003	/	0,0014 ± 0,0002	/
AIC3	0,0034 ± 0,0016	/	0,0046 ± 0,0020	/	0,0079 ± 0,0074	/	0,0033 ± 0,0007	/
Ganciclovir	1,95 ± 0,74	/	2,22 ± 0,90	/	1,89 ± 1,24	/	1,97 ± 0,62	/
Bay 38-4766^e	0,2594 ± 0,0645	/	0,3521 ± 0,1621	/	0,5137 ± 0,1133	/	1,0711 ± 0,0170	4
BDCRB^e	0,2319 ± 0,0604	/	0,2845 ± 0,0312	/	0,1972 ± 0,0269	/	0,3049 ± 0,0433	/

^aEC₅₀-Werte wurden über Fluoreszenzreduktions-Experimente ermittelt. Die Daten sind Mittelwerte von mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten und werden mit ihrer Standardabweichung abgebildet.

^bResistenz Index (RI) = EC₅₀ RV-HG Mutante / EC₅₀ RV-HG wt

^cResistent gegen AIC246

^dResistent gegen Bay 38-4766

^eIn der Entwicklung eingestellter Terminaseinhibitor

Die leicht unterschiedlichen EC₅₀-Werte der selektionierten Viren im Vergleich zu den generierten Viren sind höchstwahrscheinlich auf die unterschiedlichen Experimente zur Bestimmung der antiviralen Aktivität zurückzuführen (Fluoreszenz- versus Plaquereduktionsexperiment) (vgl. Tab. 27 und 32). Keine rekombinante UL56-Virusmutante zeigte eine Kreuzresistenz zu AIC2, AIC3 bzw. GCV (vgl. Tab. 32). Für die publizierten Terminaseinhibitoren Bay 38-4766 und BDCRB wurde beschrieben, dass Mutationen in pUL56 bzw. pUL89 eine antivirale Resistenz vermitteln können (45, 169). Daher stellte sich die Frage, ob die rekombinanten RV-HG-UL56-Mutanten Kreuzresistenzen gegenüber diesen Terminaseinhibitoren aufweisen. Wie Tabelle 32 zeigt, konnte keine AIC246/BDCRB-Kreuzresistenz festgestellt werden. Allerdings wies RV-HG-UL56-C325Y, eine Virusmutante mit einem Resistenzindex von 11.000 gegenüber AIC246, eine schwache Bay 38-4766-Kreuzresistenz auf (vgl. Tab. 32).

Die Suszeptibilitäts-Analyse zeigt, dass eine einzelne Aminosäuresubstitution innerhalb der großen Terminaseuntereinheit pUL56 (UL56-L241P, UL56-R369S, UL56-C325Y) ausreichte, um in Zellkultur eine AIC246-Resistenz zu vermitteln. Dies führt zu der Hypothese, dass AIC246, ähnlich wie Bay 38-4766 bzw. BDCRB, mit der viralen Terminaseuntereinheit pUL56 interferiert. Unterstützt wird diese Hypothese durch die schwache Bay 38-4766-Kreuzresistenz der AIC246-resistenten

Virusmutante RV-HG-UL56-C325Y. Da allerdings keine Bay 38-4766-Kreuzresistenz bei den anderen AIC246-resistenten rekombinanten Virusmutanten beobachtet wurde und keine AIC246-resistente Virusmutante eine BDCRB-Kreuzresistenz aufweist, liegt die Vermutung nahe, dass sich die Interaktion von AIC246 mit pUL56 auf molekularer Ebene von der Bay 38-4766- bzw. BDCRB-Interaktion mit der großen Terminaseuntereinheit unterscheidet.

Mit dem Nachweis, dass singuläre Aminosäuresubstitutionen in der großen Terminaseuntereinheit pUL56 eine AIC246-Resistenz vermitteln, wurden die Experimente zur Aufklärung des molekularen Wirkmechanismus von AIC246 im Rahmen dieser Arbeit beendet und der weitere Fokus auf die molekularen Wirkmechanismen der Inhibitoren AIC2 und AIC3 gelegt.

Teile der zur Analyse des Wirkmechanismus von AIC246 durchgeführten Experimente wurden bereits publiziert (117, 178).

C.6.4.2 Rekombinante UL86-Virusmutanten

Die Suszeptibilitäts-Analysen der RV-HG-UL86-Mutanten zeigten, dass singuläre definierte Aminosäuresubstitutionen innerhalb von UL86 eine AIC2-Resistenz bzw. eine AIC2/AIC3-Kreuzresistenz vermitteln. Dabei weisen mit Ausnahme von RV-HG-UL86-C1315Y alle rekombinanten RV-HG-UL86-Mutanten eine AIC2/AIC3-Kreuzresistenz auf (vgl. Tab. 33 und 34).

Tab. 33: Suszeptibilität der UL86-mutierten rekombinanten Viren im Vergleich zu RV-HG gegen AIC246, AIC2 bzw. AIC3

Virus	EC ₅₀ ^a [µM]					
	AIC246	RI ^b	AIC2	RI ^b	AIC3	RI ^b
RV-HG (HCMV wt)	0,0024 ± 0,0008	/	0,0014 ± 0,0004	/	0,0034 ± 0,0016	/
RV-HG-UL86-A436D ^e	0,0042 ± 0,0007	/	0,0253 ± 0,0079	18	0,1859 ± 0,0238	54
RV-HG-UL86-G525D ^e	0,0046 ± 0,0009	/	0,0187 ± 0,0104	13	0,0482 ± 0,0112	14
RV-HG-UL86-C1315Y ^d	0,0033 ± 0,0003	/	2,2396 ± 1,70	1600	0,0030 ± 0,0016	/
RV-HG-UL86-C1315Y-Rev. ^c	0,0038 ± 0,0013	/	0,0028 ± 0,0009	/	0,0101 ± 0,0034	/
RV-HG-UL86-F1225L ^e	0,0024 ± 0,0006	/	0,07 ± 0,02	50	1,86 ± 0,45	547

^aEC₅₀ -Werte wurden über Fluoreszenzreduktions-Experimente ermittelt. Die Daten sind Mittelwerte von mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten und werden mit ihrer Standardabweichung abgebildet.

^bResistenz Index (RI) = EC₅₀ RV-HG Mutante / EC₅₀ RV-HG wt

^cRev.: Revertante

^dResistent gegen AIC2

^eResistent gegen AIC2 und AIC3

Tab. 34: Suszeptibilität der UL86-mutierten rekombinanten Viren im Vergleich zu RV-HG gegen den zugelassenen Polymeraseinhibitor GCV sowie die Terminaseinhibitoren Bay 38-4766 und BDCRB

Virus	EC ₅₀ ^a [µM]					
	Ganciclovir	RI ^b	Bay 38-4766 ^c	RI ^b	BDCRB ^c	RI ^b
RV-HG (HCMV wt)	1,95 ± 0,74	/	0,2594 ± 0,0645	/	0,2319 ± 0,0604	/
RV-HG-UL86-A436D	3,65 ± 0,00	/	0,6765 ± 0,0501	/	0,8385 ± 0,3557	/
RV-HG-UL86-G525D	2,51 ± 1,33	/	0,3101 ± 0,1346	/	0,3101 ± 0,1380	/
RV-HG-UL86-F1225L	1,97 ± 1,46	/	0,5038 ± 0,0489	/	0,4772 ± 0,0687	/
RV-HG-UL86-C1315Y	2,93 ± 1,30	/	0,4035 ± 0,1442	/	0,2479 ± 0,1128	/
RV-HG-UL86-C1315Y-Rev. ^d	2,55 ± 1,82	/	0,6694 ± 0,0951	/	0,5894 ± 0,0054	/

^aEC₅₀-Werte wurden über Fluoreszenzreduktions-Experimente ermittelt. Die Daten sind Mittelwerte von mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten und werden mit ihrer Standardabweichung abgebildet.

^bResistenz Index (RI) = EC₅₀ RV-HG Mutante / EC₅₀ RV-HG (Wildtyp)

^cin der Entwicklung eingestellter Terminaseinhibitor

^dRev.: Revertante

Diese Kreuzresistenz ist in Abhängigkeit von der generierten UL86-Aminosäuresubstitution A436D, G525D bzw. F1225L unterschiedlich stark ausgeprägt (vgl. Tab. 33). Dabei zeigt der ausschließlich AIC2-resistente Virusstamm RV-HG-UL86-C1315Y die höchste AIC2-Resistenz (1600-fach) (vgl. Tab. 33). Um zu bestätigen, dass die im Vergleich hohe AIC2-Resistenz ausschließlich durch die UL86-C1315Y-Aminosäuresubstitution vermittelt wird, wurde eine Revertante (RV-HG-UL86-C1315Y-Rev.) generiert. Diese zeigte eine vergleichbare AIC2-Suszeptibilität mit RV-HG, was wiederum bestätigt, dass der 1600fach erhöhte EC₅₀-Wert ausschließlich auf die inserierte Punktmutation zurückzuführen ist (vgl. Tab. 33).

Wie erwartet, wiesen alle rekombinanten UL86-Virusmutanten in Zellkultur keine Kreuzresistenz zu AIC246, BDCRB, Bay 38-4766 bzw. GCV auf (vgl. Tab. 33 und 34).

Die Suszeptibilitäts-Analysen der rekombinanten UL86-Virusmutanten bestätigen die Annahme, dass einzelne Aminosäuresubstitutionen innerhalb des UL86 ORF eine AIC2-Resistenz (C1315Y) bzw. AIC2/AIC3-Kreuzresistenz (A436D, G525D, F1225L) vermitteln. Somit kann vermutet werden, dass AIC2 bzw. AIC3 mit dem HCMV-Hauptkapsidprotein bzw. mit dessen Funktion interferiert. Die beobachteten Kreuzresistenzen deuten darauf hin, dass AIC2 und AIC3 eine ähnliche Interaktion mit dem Hauptkapsidprotein MCP eingehen, obwohl es sich um chemisch verschiedene Substanzklassen handelt. Dieser neuartige Wirkmechanismus unterscheidet AIC2 und AIC3 von allen bisher publizierten HCMV-Inhibitoren.

Neben den oben beschriebenen rekombinanten RV-HG-UL86-Virusmutanten wurde im Rahmen der Markertransfer-Analysen ein weiteres Bacmid - pHG-UL86-R583L - generiert. Im Anschluss wurden MCR-5-Zellen zur Rekonstitution von infektiösem Virus mit pHG-UL86-R583L transfiziert. Die Effizienz der Transfektion konnte anhand der EGFP-Expression nachgewiesen werden, jedoch bildeten sich keine Virusplaques (vgl. Abb. 34). Eine Analyse des rekombinanten Bacmids über erweiterte RFLP-Analysen sowie eine erneute Sequenzierung zeigte keine Auffälligkeiten, weshalb eine erneute Virusrekonstitution von RV-HG-UL86-R583L in Anwesenheit von AIC2 ($10 \times EC_{50}$) durchgeführt wurde. Innerhalb von acht Tagen konnte auf diese Art eine Plaquebildung beobachtet werden (vgl. Abb. 34). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die UL86-R583L-Substitution möglicherweise destabilisierend auf die Struktur des Hauptkapsidproteins wirkt und dieser Effekt durch die Verabreichung von AIC2 kompensiert wird. Passend dazu stellte sich heraus, dass eine Kryokonservierung von unter AIC2 gezogenem RV-HG-UL86-R583L zu einem nahezu vollständigen Verlust der Infektiosität führte, was wiederum auf eine Destabilisierung des Virus-Kapsids durch die R583L-Mutation hindeutet. Umgekehrt kann vermutet werden, dass AIC2 einen stabilisierenden Effekt auf die Virusstruktur ausübt, die im Zuge der Kryokonservierung verloren geht.

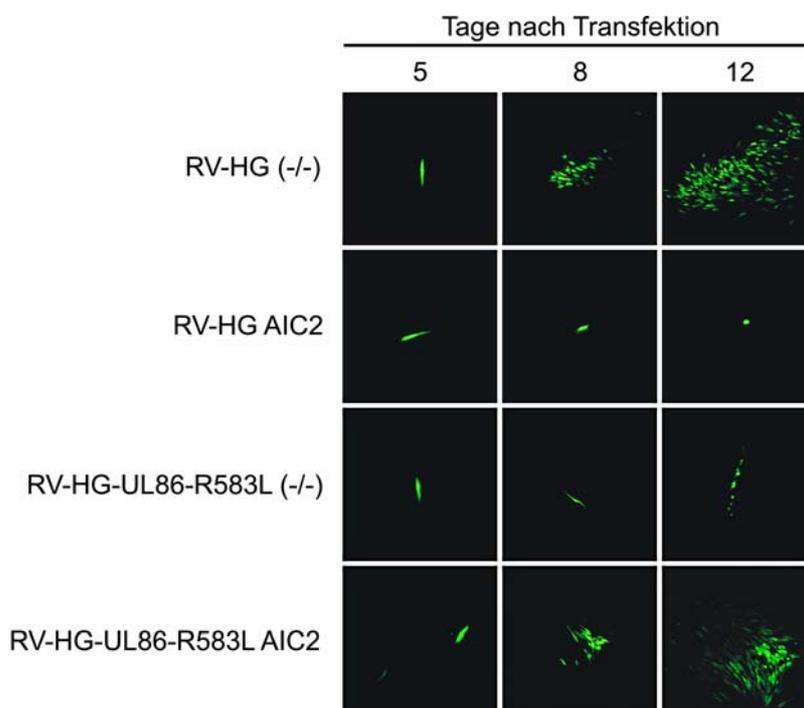
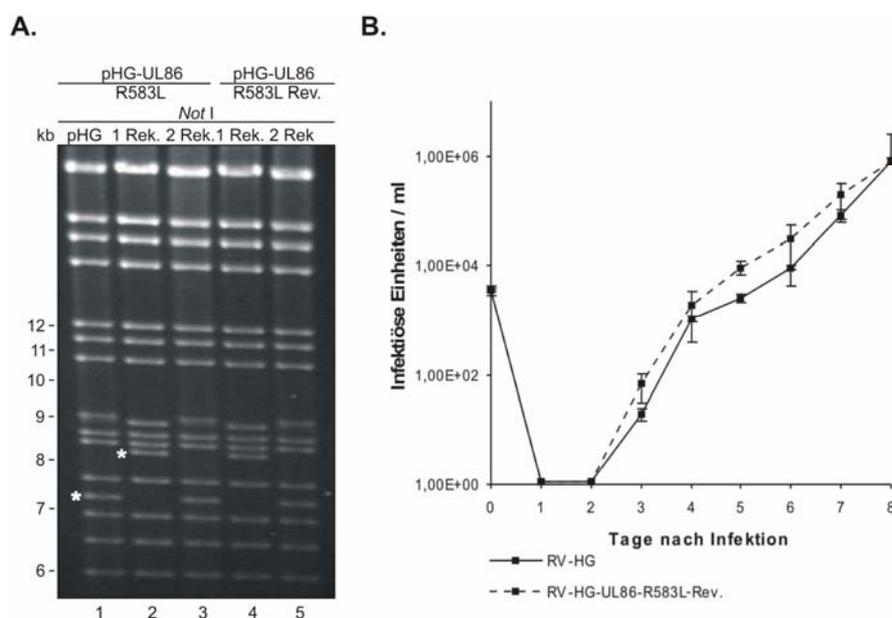


Abb. 34: Virusrekonstitution von RV-HG und RV-HG-UL86-R583L in An- und Abwesenheit von AIC2

Abb. 34: Fortgesetzt

Subkonfluente MRC-5-Zellen wurden mit pHG bzw. pHG-UL86-R583L transfiziert (vgl. B.2.2.2). Nach vier Stunden wurde den Ansätzen Placebo bzw. AIC2 ($10 \times EC_{50}$) zugeführt. Die EGFP-Expression wurde anschließend nach fünf, acht und zwölf Tagen dokumentiert.

Um die oben genannten Hypothesen zu untermauern, sollte als nächstes mit einem Kontrollexperiment ausgeschlossen werden, dass der beobachtete Wachstumsdefekt von RV-HG-UL86-R583L auf eine andere als die identifizierte UL86-R583L-Mutation zurückzuführen ist. Zu diesem Zweck wurde nachfolgend eine Revertante erzeugt (RV-HG-UL86-R583L-Rev.), erfolgreich rekonstituiert und einer Replikationsanalyse unterzogen (vgl. Abb. 35).

**Abb. 35: Markertransfer und Wachstumskinetik der RV-HG-UL86-R583L-Revertante**

(A) RFLP-Analyse der Bacmid DNA der Rekombinanten des UL86-R583L- (Spur 1 - 3) bzw. UL86-R583L-Rev.-Markertransfers (Spur 3 - 5). Die Bacmid-DNA wurde jeweils mit *Not* I geschnitten und über ein 0,8%iges Agarosegel getrennt. Die durch die Insertion der Rekombinationskassette veränderten Restriktionsbanden sind mit einem Stern gekennzeichnet. 1 Rek.: Intermediat der ersten Rekombination; 2 Rek.: Rekombinantes Bacmid der zweiten Rekombination; kb: Kilobasen.

(B) Mehrschritt-Wachstumskinetik von RV-HG-UL86-R583L Rev. im Vergleich zu RV-HG.

NHDF-Zellen wurden mit RV-HG bzw. RV-HG-UL86-R583L Rev. (MOI 0,1) infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde der Zellkulturüberstand gewonnen. Die Bestimmung der Virustiter erfolgte mittels IE1-Detektion (vgl. B.2.2.4). Die Standardabweichungen resultieren aus der entsprechenden Dreifachbestimmung.

Die Auswertung der Wachstumskurven ergab eine vergleichbare Wachstumskinetik von RV-HG und RV-HG-UL86-R583L-Rev. Das Ergebnis bestätigt die Hypothese, dass die UL86-R583L-Aminosäuresubstitution neben der AIC2/AIC3-Kreuzresistenz die beobachtete Replikationsdefizienz vermittelt.

C.7 Die Resistenzmutation UL86-R583L - Schlüssel zur weiteren Charakterisierung des AIC2/AIC3-Wirkmechanismus?

Die Beobachtung, dass die UL86-R583L-Mutation einen Replikationsdefekt induziert und dieser Effekt durch die Verabreichung von AIC2 kompensiert werden kann, grenzt die UL86-R583L-Aminosäuresubstitution von allen anderen bisher analysierten UL86-Aminosäuresubstitutionen ab. Im Kontext der Analyse des AIC2-Wirkmechanismus wurden daher die funktionellen Eigenschaften der UL86-R583L-Aminosäuresubstitution untersucht.

C.7.1 Isolierung einer replikationskompetenten *rescue*-Virusmutante

In einem ersten Schritt wurde versucht, eine *rescue*-Mutante zu selektieren, die den Wachstumsdefekt der rekombinanten UL86-R583L-Virusmutante kompensieren kann. Für diesen Zweck wurde RV-HG-UL86-R583L sukzessiv mit einer abnehmenden AIC2-Konzentration inkubiert und letztendlich nur mit NHDF-Zellkulturmedium kultiviert (vgl. Tab. 22). Auf diese Weise gelang es, eine Virusmutante zu isolieren, die in An- und Abwesenheit von AIC2 repliziert. Dieser neue Virusklon wurde aufgrund seiner zu RV-HG-UL86-R583L (Klon 1) abweichenden phänotypischen Eigenschaft zunächst als RV-HG-UL86-R583L Klon 2 bezeichnet.

C.7.2 Vergleichende Phänotypisierung der UL86-R583L-Virusmutanten

C.7.2.1 Fokus-Expansions-Analysen

Um die unterschiedlichen Replikationseigenschaften der beiden RV-HG-UL86-R583L-Mutanten im Vergleich näher zu charakterisieren und um zu prüfen, ob diese neben einer AIC2- auch eine AIC3-Resistenz vermitteln, wurden Fokus-Expansions-Analysen in An- bzw. Abwesenheit von Substanz durchgeführt. Hierfür wurden NHDF-Zellen jeweils mit RV-HG, RV-HG-UL86-R583L Klon 1 bzw. Klon 2 infiziert

und mit Placebo, AIC2 bzw. AIC3 versehen. Die Plaquebildung wurde anschließend in definierten Zeitabständen anhand der Ausbreitung der EGFP-Expression der infizierten Zellen dokumentiert (vgl. Abb. 36).

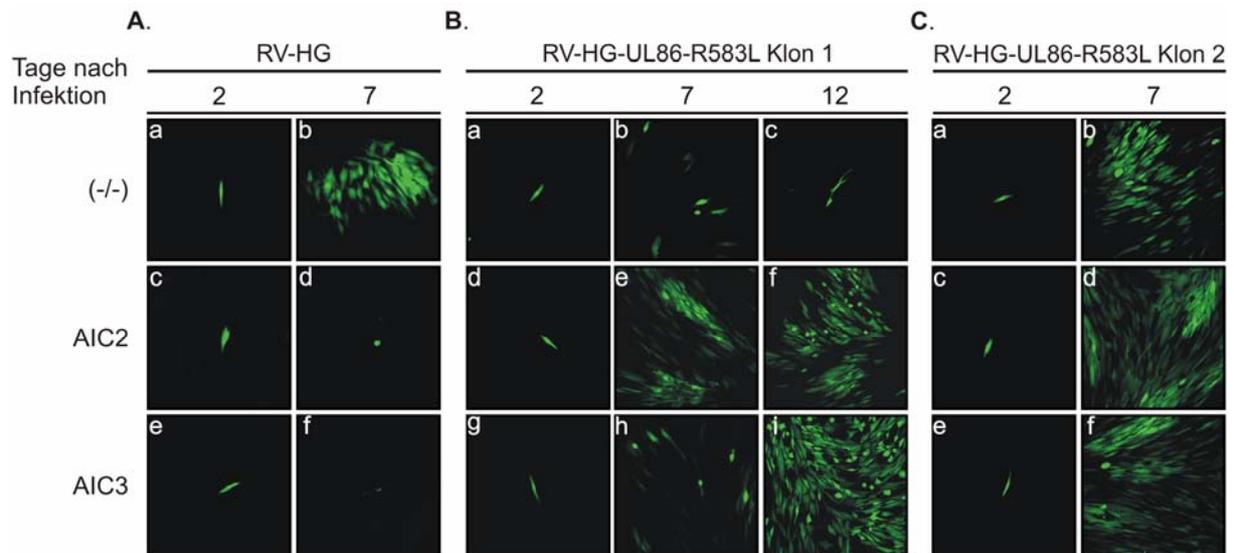


Abb. 36: Fokus-Expansion der Virusmutanten RV-HG-UL86-R583L Klon 1 und Klon 2 in An- und Abwesenheit von AIC2 bzw. AIC3 im Vergleich zu RV-HG

NHDF-Zellen wurden mit RV-HG (**A**), RV-HG-UL86-R583L Klon 1 (**B**) bzw. RV-HG-UL86-R583L Klon 2 (**C**) infiziert und im Anschluss mit Placebo, AIC2 bzw. AIC3 ($10 \times EC_{50}$) inkubiert. Nach zwei, sieben und zwölf Tagen wurde das Wachstum einzelner Plaques dokumentiert.

In Abwesenheit von AIC2 bzw. AIC3 bildeten sich bei mit RV-HG infizierten NHDF-Zellen, wie erwartet, Virusplaques (vgl. Abb. 36 A, a und b), während die Zugabe von AIC2 bzw. AIC3 zu einer vollständigen Inhibition der Virusreplikation führte (vgl. Abb. 36 A; c und d; e und f).

Komplett gegensätzlich war das Bild einer Infektion mit RV-HG-UL86-R583L Klon 1. Hier bildeten sich ohne Substanz keine Virusplaques (vgl. Abb. 36, a - c), während in Anwesenheit von AIC2 bzw. AIC3 sieben Tage nach Infektion eine Fokus-Expansion dokumentiert werden konnte (vgl. Abb. 36 B; d - f und g - i).

Wie bereits erwähnt, konnte bei der Virusmutante RV-HG-UL86-R583L Klon 2 wieder eine substanzunabhängige Fokus-Expansion in Anwesenheit von AIC2 festgestellt werden. Darüber hinaus zeigte die Virusmutante - wie RV-HG-UL86-R583L Klon 1 - eine AIC2/AIC3-Kreuzresistenz, da auch hier eine Plaquebildung in Anwesenheit von AIC3 beobachtet wurde (vgl. Abb. 36 C, a und b, c und d bzw. e und f).

C.7.2.2 Replikationsanalysen

Da Fokus-Expansions-Analysen keine exakte Charakterisierung einer viralen Replikationskinetik ermöglichen und sich die Frage stellte, inwieweit AIC2 das Wachstumsverhalten der rekombinanten UL86-R583L-Virusmutanten im Vergleich zum Wildtypvirus RV-HG wieder ermöglicht, wurde in einem Folgeexperiment eine Wachstumskinetik durchgeführt. Aufgrund der Beobachtung, dass RV-HG-UL86-R583L Klon 1 nur *in Anwesenheit* von Substanz repliziert, konnte dabei lediglich die Wachstumskinetik von RV-HG-UL86-R583L Klon 2 *in An- und Abwesenheit* von AIC2 charakterisiert werden (vgl. Abb. 37).

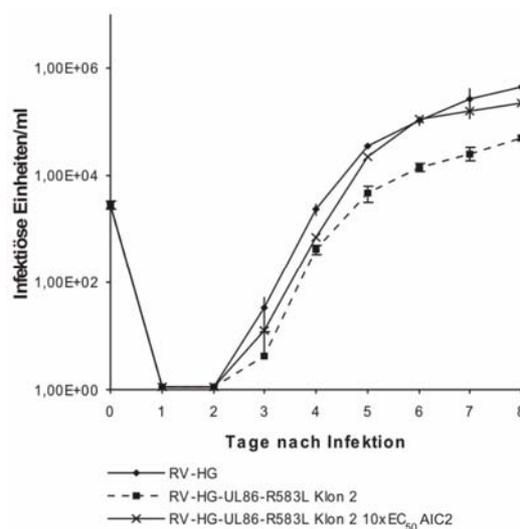


Abb. 37: Mehrschritt-Wachstumskinetik von RV-HG-UL86-R583L Klon 2 in An- und Abwesenheit von AIC2

NHDF-Zellen wurden mit RV-HG bzw. RV-HG-UL86-R583L Klon 2 (MOI 0,1) infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde der Zellkulturüberstand gewonnen. Die Bestimmung der Virustiter erfolgte mittels IE1-Detektion (vgl. B.2.2.4). Die Standardabweichungen resultieren aus der entsprechenden Dreifachbestimmung.

Das Experiment, dargestellt in Abbildung 37, zeigte für RV-HG-UL86-R583L Klon 2 in Anwesenheit von AIC2 ein mit RV-HG vergleichbares Wachstumsverhalten, während in Abwesenheit von AIC2 ein um eine Zehnerpotenz reduzierter Virustiter gemessen wurde (vgl. Abb. 37). Die Ergebnisse zeigen somit, dass RV-HG-UL86-R583L Klon 2 ein Wachstumsdefizit aufweist, welches von AIC2 vollständig ausgeglichen wird.

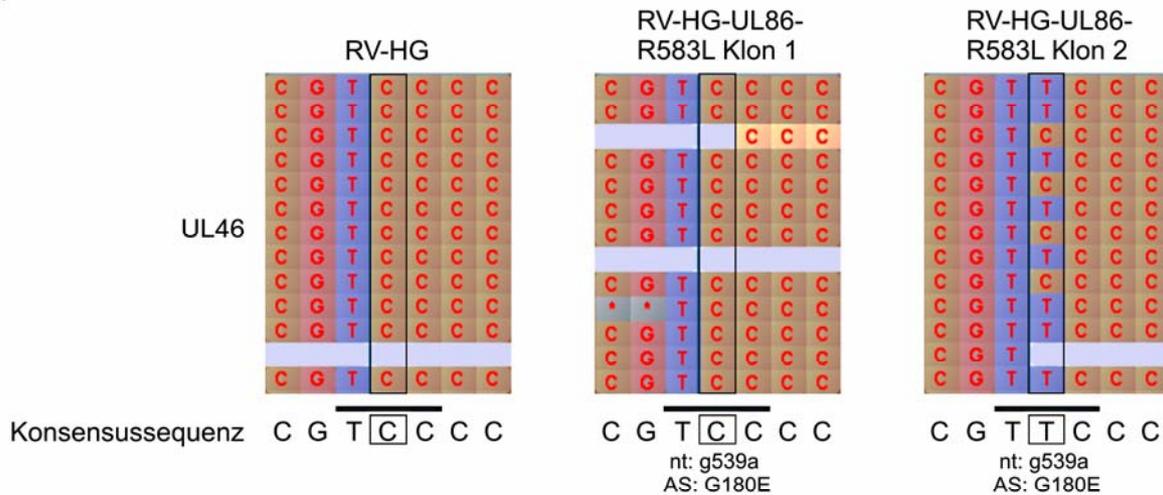
Zusammengefasst deuten diese Experimente darauf hin, dass die UL86-R583L-Aminosäuresubstitution für die beobachtete AIC2/AIC3-Kreuzresistenz verantwortlich ist und dass ein zweiter, unbekannter Polymorphismus in RV-HG-UL86-R583L Klon 2 den Wachstumsdefekt der UL86-R583L-Mutation kompensiert.

C.7.3 Kartierung einer putativen *rescue*-Mutation durch vergleichende Sequenzanalysen

Bei der Sequenzanalyse des UL86 ORF von RV-HG-UL86-R583L Klon 2 wurde außer der bekannten UL86-R583L-Mutation keine weitere Mutation detektiert. Daher wurde angenommen, dass eine oder mehrere unbekannte zusätzliche Mutationen in einem oder mehreren anderen Leserahmen die Virusreplikation dieses neuen Virusklons in Abwesenheit von Substanz ermöglichen. Um die unbekannte *rescue*-Mutation bzw. Mutationen innerhalb des HCMV-Genoms zu identifizieren, sollten im Folgenden die vollständigen Genome von RV-HG, RV-HG-UL86-R583L Klon 1 bzw. Klon 2 einer Hochdurchsatz-Sequenzanalyse (*deep sequencing*) unterzogen und nachfolgend die generierten Sequenzdaten verglichen werden. Zu diesem Zweck wurden hochtitrige Virusstocks von RV-HG und RV-HG-UL86-R583L-Klon 2 in Abwesenheit bzw. von RV-HG-UL86-R583L Klon 1 in Anwesenheit von AIC2 (10 x EC₅₀) erzeugt. Anschließend wurden die Viruspartikel des entsprechenden Virusstocks mittels einer Ultrazentrifuge pelletiert und nachfolgend das jeweilige virale Genom gereinigt (vgl. B.2.3.6). Die Hochdurchsatz-Sequenzanalyse (Illumina HiSeq 2000) wurde bei GATC (Konstanz) durchgeführt.

Bei der nachfolgenden Sequenzauswertung wurden nur Sequenzpolymorphismen innerhalb der HCMV-ORFs berücksichtigt. Dabei wurden diejenigen Sequenzpolymorphismen selektiert, die ausschließlich bei RV-HG-UL86-R583L Klon 2 und nicht bei der Wildtypsequenz (RV-HG) bzw. RV-HG-UL86-R583L Klon 1 detektiert wurden. Bemerkenswerterweise wurde dabei einzig im *minor capsid binding protein* pUL46 ein Polymorphismus identifiziert (nt: g539a, AS: G180E) (vgl. Abb. 38 A). Darüber hinaus zeigte die Sequenzanalyse, dass sowohl RV-HG-UL86-R583L Klon 1 und 2 die mittels *En-passant*-Mutagenese inserierte Nukleotidsubstitution aufweisen (nt: g1748t, AS: R583L) (vgl. Abb. 38 B).

A.



B.

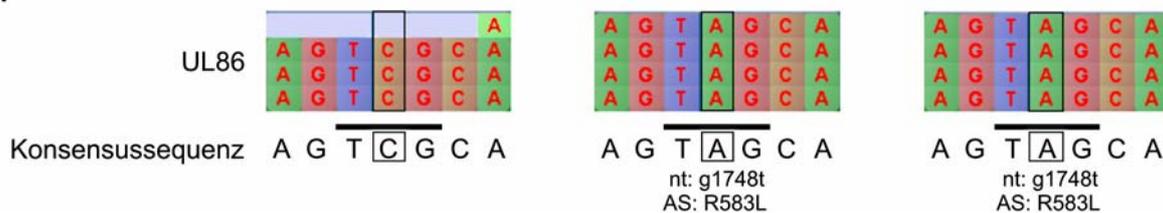


Abb. 38: Sequenzanalyse von RV-HG und den rekombinanten Virusmutanten RV-HG-UL86-R583L Klon 1 und Klon 2

Die Genome von RV-HG, RV-HG-UL86-R583L Klon 1 und Klon 2 wurden isoliert und vollständig einer Hochdurchsatz-Sequenzanalyse unterzogen (*deep sequencing*, GATC Biotech, Konstanz). Die Tablett-Darstellung wurde auf zwölf **(A)** bzw. vier **(B)** Sequenzabdeckungen der jeweiligen Zielregionen gekürzt. Hellblau: Fehlende Sequenzabdeckung. Fehlerhafte Sequenzdaten sind mit einem roten Punkt dargestellt.

(A) Tablett-Darstellung des UL46-Sequenzabschnitts nt: 536-542. Ausschnitt aus der 20-fachen (RV-HG-UL86-R583L Klon 1), 21-fachen bzw. 27-fachen (RV-HG-UL86-R583L Klon 2) Sequenzabdeckung der Zielregion (209). Die zusätzlich detektierte Wildtypsequenz (33%) ist auf eine Mischkultur, bestehend aus RV-HG-UL86-R583L Klon 1 und 2, zurückzuführen.

(B) Tablett-Darstellung des UL86-Sequenzabschnitts nt: 1745-1751. Ausschnitt aus der 25-fachen (RV-HG und RV-HG-UL86-R583L Klon 1) bzw. 20-fachen (RV-HG-UL86-R583L Klon 2) Sequenzabdeckung der Zielregion.

Das Ergebnis der Sequenzanalyse deckt sich mit der Hypothese, dass die UL86-R583L-Mutation die Struktur des Hauptkapsidproteins destabilisiert und dieser Effekt möglicherweise durch eine *rescue*-Mutation kompensiert wird. So bildet das *minor capsid binding protein* pUL46 mit zwei Kopien des minor capsid proteins pUL85 ein Trimer (Triplex), das mit den Hauptkapsidproteinen interagiert und die Nukleokapsidstruktur stabilisiert (vgl. A.1.5.3 und Abb. 6) (46, 56, 112, 114, 271). Aufbauend auf diesen Ergebnissen stellte sich die Frage, inwieweit die G180E-

Aminosäuresubstitution des *minor capsid binding proteins* die UL86-R583L-vermittelte Replikationsdefizienz auf struktureller Ebene kompensiert.

C.8 Analysen zur Lokalisation AIC2- bzw. AIC3-Resistenz vermittelnder Aminosäuresubstitutionen innerhalb der 3D-Struktur des HCMV-Hauptkapsidproteins MCP

Die Sequenzanalyse der AIC2- bzw. AIC3-resistenten Virusstämme sowie die nachfolgenden Markertransfer-Analysen bestätigten die Vermutung, dass eine singuläre Aminosäuresubstitution innerhalb des MCP eine AIC2-Resistenz bzw. AIC2/AIC3-Kreuzresistenz vermittelt. Dabei unterscheidet sich in Abhängigkeit von der Position der Mutation die Art und Ausprägung der Resistenz. So führte die Aminosäuresubstitution UL86-C1315Y zu einer 1600-fach erhöhten AIC2-Suszeptibilität, während eine UL86-F1225L-Substitution eine 50-fach erhöhte AIC2- sowie eine 540-fach erhöhte AIC3-Suszeptibilität bedingte (vgl. Tab. 33). Darüber hinaus konnte eine UL86-Resistenzmutation identifiziert werden (UL86-R583L), die in Abwesenheit von Substanz einen Replikationsdefekt vermittelt und möglicherweise partiell durch eine Mutation im *minor capsid binding protein* kompensiert wird (nt: g539a, AS: G1801E). In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob die oben beschriebenen phänotypischen Beobachtungen durch die Lage und Art der jeweiligen Mutation innerhalb des Proteins mechanistisch erklärt werden können.

Bis zum heutigen Zeitpunkt liegt für das HCMV-Hauptkapsidprotein MCP kein Strukturmodell vor, welches es ermöglicht, die Position der jeweiligen resistenzvermittelnden Aminosäuresubstitutionen zu lokalisieren. Jedoch ist bekannt, dass die Struktur der Nukleokapside innerhalb der Herpesviren hoch konserviert ist. Außerdem ist für HSV-1 ein auf Röntgenstrukturanalyse basierendes Modell der oberen Domäne des zu MCP homologen Hauptkapsidproteins VP5 (1NO7) bereits publiziert worden (38, 46, 311, 334). Darüber hinaus wurde, in Verbindung mit einer auf Kryo-EM-Daten basierenden Bildrekonstruktion des HSV-1 Nukleokapsids, eine putative HSV-1 VP5-Tertiärstruktur veröffentlicht (9).

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde deshalb versucht, ein Modell der HCMV MCP-Tertiärstruktur zu generieren, das Erkenntnisse über die Lage der AIC2- bzw. AIC3-Resistenz vermittelnden Mutationen innerhalb des Proteins liefert.

Im Einzelnen wurde dabei wie folgt verfahren:

Da HSV-1 zu den α - und HCMV zu den β -Herpesviren zählt, stellte sich zunächst die Frage, ob die Struktur der viralen Nukleokapside vergleichbar ist. Daher wurde zu Beginn die HSV-1- mit der HCMV-Nukleokapsidstruktur verglichen. Nachfolgend wurde untersucht, inwieweit die Primär- und Sekundärstrukturen der Hauptkapsidproteine HSV-1 VP5 und HCMV MCP zueinander homolog sind. Aufbauend auf dem VP5 1NO7-Strukturmodell wurde im Anschluss ein komparatives Modell der oberen Domäne von HCMV MCP generiert. Anhand dieses Modells konnte nun eine Identifizierung der putativen Penton- und Hexon-Interaktionsdomänen, verbunden mit einer strukturellen Zuordnung der resistenzvermittelnden Aminosäuresubstitutionen, erfolgen.

C.8.1 Vergleich der HCMV- und HSV-1-Nukleokapsidstruktur

Zu Beginn wurden die HSV-1- und die HCMV-Nukleokapsidstrukturen verglichen, um zu prüfen, inwieweit deren Strukturen übereinstimmen (vgl. Abb. 39) (44, 264, 289). Bekannt ist, dass beide Nukleokapside in ihrer Aufsicht bzw. ihrem Querschnitt nur geringfügig voneinander abweichen, was unter anderen auf die vergleichbaren Hexon- und Penton-Strukturen zurückzuführen ist (vgl. Abb. 39) (44, 264, 289).

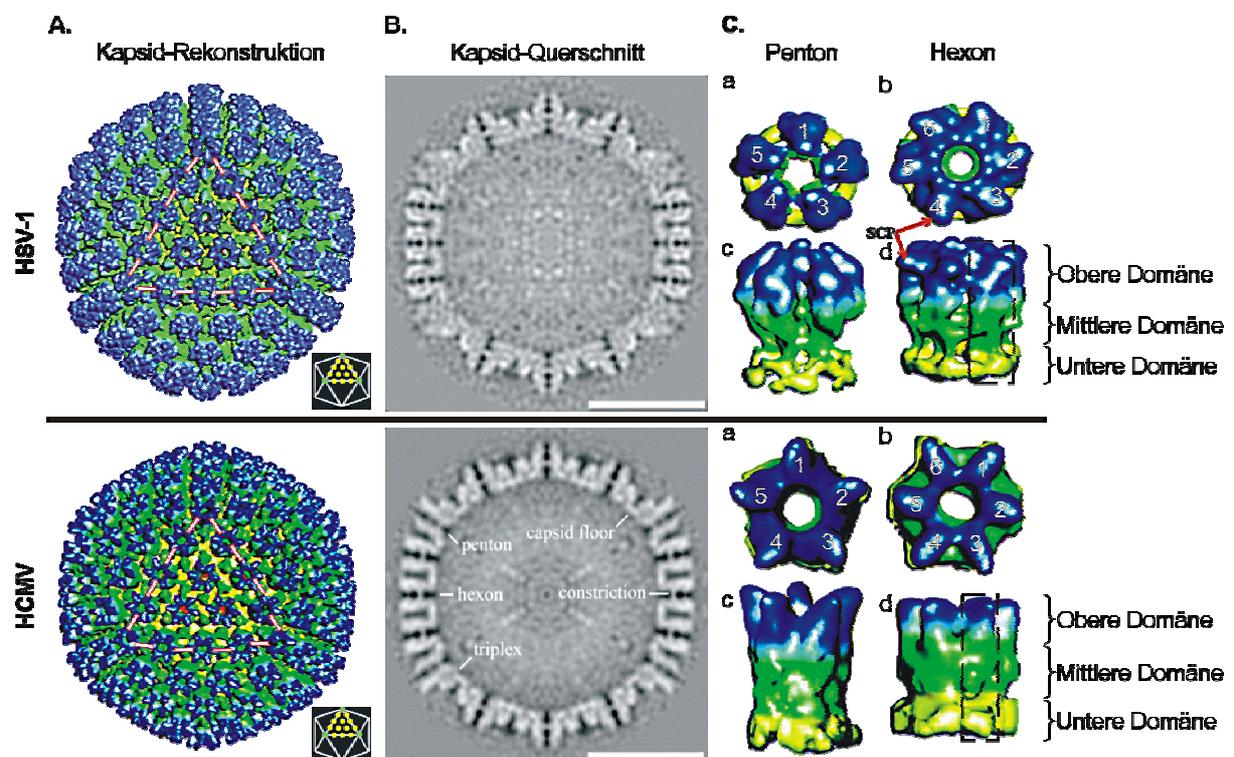


Abb. 39: Vergleich der Nukleokapsidstrukturen von HSV-1 und HCMV

Abb. 39: Fortgesetzt

(A) Aufsicht auf die zweifache Symmetrieachse des ikosaedrischen Nukleokapsids. Die Anordnungen der Pentone (grün) und Hexone (gelb) innerhalb eines Dreiecks des T16-Gitters sind schematisch dargestellt (vgl. kleine Abbildung unten rechts). Die Nukleokapside wurden radial koloriert. Die oberen, zur Oberfläche exponierten Domänen der Pentone und Hexone, bestehend aus dem *major capsid protein* (HSV-1: VP5; HCMV: MCP/pUL86), sind blau dargestellt. Die verbindenden Triplexen, bestehend aus dem *minor capsid protein* und dem *minor capsid binding protein* (HSV-1: pUL18, pUL38; HCMV: pUL45, pUL85), lokalisieren im mittleren Bereich der Nukleokapsidhülle und sind grün dargestellt. Der an die Innenseite der Hüllstruktur angrenzende Bereich ist gelb dargestellt.

(B) Ultradünnschnitte durch die Nukleokapsid-Rekonstruktionen. Die strukturellen Komponenten sind gekennzeichnet. Die Balkenlänge entspricht 50 nm.

(C) Auf- (a und b) und Seiten-Ansicht (c und d) einzelner Pentone und Hexone, die aus der HSV-1- bzw. HCMV-Nukleokapsid-Rekonstruktion isoliert wurden (39, 240, 245). Pentone bestehen aus fünf, Hexone aus sechs Monomeren des jeweiligen Hauptkapsidproteins (VP5 bzw. MCP) (vgl. jeweils a und b). An der oberen Spitze einer jeden Hexonuntereinheit befindet sich das *small capsid protein* (vgl. HSV-1 b und d). Die Pentone und Hexone sind analog zu A radial koloriert. Die obere, nach außen ragende Penton- bzw. Hexonstruktur ist blau (obere Domäne), die im mittleren Bereich der Nukleokapsidhülle lokalisierte Struktur ist grün (mittlere Domäne) und der an die Innenseite der Hüllstruktur angrenzende Bereich ist gelb dargestellt (untere Domäne). Verändert nach (46, 334, 346)

Diese Strukturen bestehen jeweils aus fünf (Penton-) bzw. sechs (Hexon-) Monomeren des Hauptkapsidproteins und werden in eine obere, mittlere und untere Domäne unterteilt, die über laterale Wechselwirkungen die Penton- und Hexon-Struktur stabilisieren (vgl. Abb. 39 C jeweils c und d) (9, 38, 46, 334, 346). Aufgrund der in der Aufsicht und im Querschnitt fast identischen sowie in der Hexon- bzw. Penton-Struktur ähnlichen Nukleokapsidstrukturen von HSV-1 und HCMV MCP wurden nachfolgend die Strukturen beider Hauptkapsidproteine (HSV-1 VP5 und HCMV MCP) verglichen.

C.8.2 Primär- und Sekundärstrukturvergleich von HSV-1 VP5 und HCMV MCP

Für einen Vergleich der Primär- und Sekundärstrukturen beider Hauptkapsidproteine wurde ein Sequenzalignment (MAFFT) mit den Aminosäuresequenzen von VP5 (NCBI: NP_044620.1) und pUL86 (NCBI: ACZ79997.1) durchgeführt (151, 152). Die Sekundärstrukturanalyse erfolgte mit Hilfe des *Protein Structure Prediction Servers* (PSIPRED, <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>) (196). Innerhalb des MAFFT-Alignments wurden anschließend die ermittelten Sekundärstrukturelemente sowie die bekannte VP5-Domänenstruktur markiert (vgl. Abb. 40) (9).

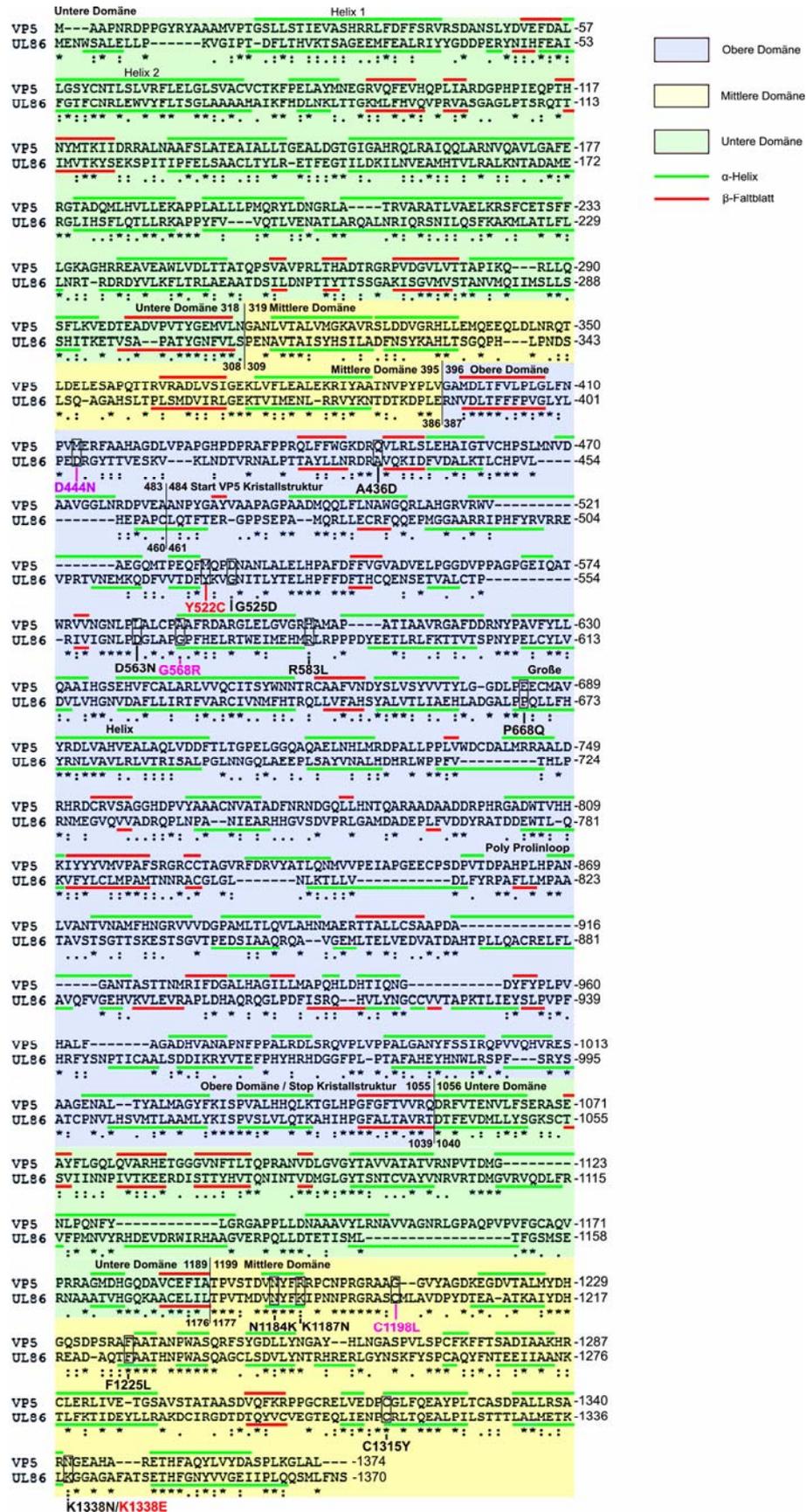


Abb. 40: MAFFT-Alignment der VP5- bzw. UL86-Aminosäuresequenz, verbunden mit einer PSIPRD-Sekundärstrukturanalyse

Abb. 40: Fortgesetzt

Die Sequenzhomologien der HSV1 VP5- und HCMV MCP-Primärsequenz wurden mit Hilfe von MAFFT (*Multiple Alignment using Fast Fourier Transform*) (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft>) ermittelt. Identische Aminosäuren (AS) sind mit einem Stern, strukturell eng verwandte Aminosäuren mit zwei Punkten und strukturell entfernter verwandte Aminosäuren mit einem Punkt gekennzeichnet. Die Sekundärstrukturvorhersagen des HSV-1 VP5- bzw. HCMV MCP-ORF wurden mit Hilfe von PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>) ermittelt und in das MAFFT-Alignment überführt. α -Helices sind mit grünen, β -Faltblätter mit roten Balken gekennzeichnet. Die großen α -Helices der unteren Domäne (Helix 1 und 2) sind entsprechend markiert (83, 347). Der Sequenzbereich der oberen Domäne ist blau, der mittleren Domäne gelb und der unteren Domäne grün unterlegt. Die potentiell AIC2- bzw. AIC3-Resistenz vermittelnden Aminosäuresubstitutionen sind mit einem schwarzen Rahmen versehen. Die Aminosäuresubstitutionen der HCMV-Stämme, bei denen zwei (AIC2-R-7 (AS: Y522C, K1338E) bzw. drei Aminosäuresubstitutionen AIC2-R-13 (AS: D444N, G568R, C1198L) innerhalb des MCP-ORF identifiziert wurden, sind in rot und pink markiert. Der Sequenzabschnitt der HSV-1 VP5 Kristallstruktur der oberen Domäne (1NO7, AS: 484-1055) ist entsprechend gekennzeichnet (38).

Die Auswertung des VP5/MCP-Sequenzalignments ergab, dass die Primärsequenzen beider Proteine zu 28% aus identischen und zu weiteren 20% aus strukturell homologen Aminosäuren (AS) bestehen. Diese sind in weiten Teilen in Clustern angeordnet, was auf für die Proteinstruktur essentielle homologe Sequenzabschnitte hinweist (vgl. Abb. 40). Der Vergleich der Sekundärstrukturen von HCMV MCP und HSV-1 VP5 ergab eine fast identische Anordnung und Abfolge der jeweiligen α -Helix- und β -Faltblatt-Strukturen (vgl. Abb. 40). Dabei zeigte sich, dass die Position hoch konservierter Teile der Primärsequenz zu großen Teilen mit der Anordnung der Sekundärstruktur beider Proteine übereinstimmt.

Basierend auf der Kristallstruktur der oberen VP5-Domäne, in Verbindung mit auf Kryo-EM-Daten basierenden Tertiärstrukturvorhersagen, konnte die VP5-Primärsequenz der VP5-Tertiärstruktur, die in eine obere, mittlere und untere Domäne unterteilt wird, zugeordnet werden (vgl. Abb. 41) (9, 38). Da die HSV-1- und die HCMV-Nukleokapsidstrukturen vergleichbar sind und beide Hauptkapsidproteine eine signifikante Sequenzhomologie (>25% Sequenzidentität) sowie eine nahezu identische Abfolge der Sekundärstruktur-Elemente aufweisen, wurde in einem nächsten Schritt die VP5-Domänenzuordnung der HSV-1 VP5-Primärsequenz auf die MCP-Primärsequenz übertragen (vgl. Abb. 40 und 41) (9, 38).

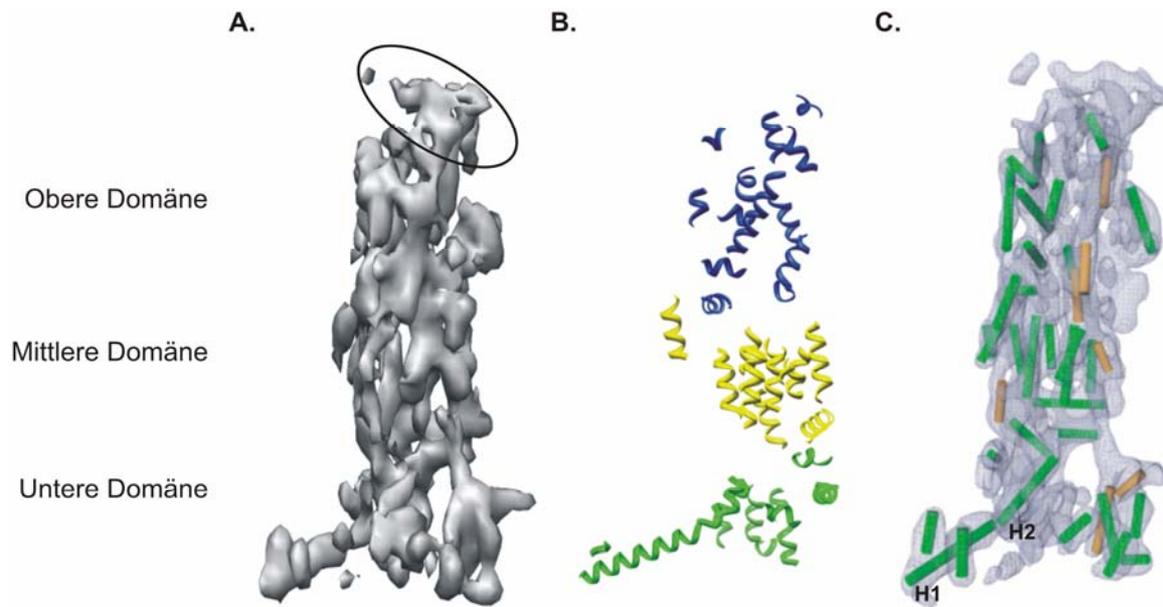


Abb. 41: Aufbau des HSV-1-Hauptkapsidproteins VP5

(A) Kryo-Elektronenmikroskopische Dichte eines aus dem HSV-1 Nukleokapsid isolierten VP5/VP26 (SCP) Hexon-Monomers. Die elektronenmikroskopische Dichte des SCP-Monomers ist mit einem Rahmen versehen (9, 346).

(B) Mit Hilfe von Helixhunter (<http://www.cgl.ucsf.edu/Research/helixhunter>) aus der VP5-Elektronendichteverteilung ermittelte, putative Anordnung der VP5 α -Helices (9).

(C) Überlagerung der VP5/VP26-Elektronendichteverteilung mit den daraus abgeleiteten VP5- α -Helices. Grün sind mit hoher Auflösung berechnete α -Helices und orange potentielle α -Helices dargestellt. Für die gekennzeichneten Helices 1 und 2 konnte eine Interaktion mit den *scaffold*-Proteinen sowie mit der unteren Domäne angrenzender VP5-Monomere gezeigt werden (83, 347).
Verändert nach (9)

Die Datensätze der VP5-Elektronendichteverteilung **(A)** bzw. der daraus abgeleiteten Positionen der α -Helices **(B)** wurden freundlicherweise von Matthew Baker, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Baylor College of Medicine, Houston, Texas zur Verfügung gestellt (9, 38).

Die Domänenstruktur von HSV-1 VP5 bzw. HCMV MCP ist in mehrere, nicht aufeinander folgende Sequenzabschnitte unterteilt. So besteht die obere, überwiegend α -helikale Domäne (VP5 AS: 396 - 1055; MCP AS: 387 - 1039) aus dem mittleren Sequenzabschnitt der Primärsequenz und repräsentiert ca. 45% des Gesamtproteins (vgl. Abb. 40 und 41) (9, 38). Die mittlere Domäne (VP5 AS: 319 - 395/1199 - 1374; MCP AS: 308 - 386/1177 - 1370) besteht aus zwei nicht zusammenhängenden Sequenzabschnitten der Primärsequenz. Sie bildet den schmalsten Bereich des Proteins und besteht aus einer engen parallelen Anordnung von neun α -Helices, die transversal von einer zehnten abgeschlossen wird

(vgl. Abb. 41 B). Dieser strukturelle Komplex bildet den schmalsten Bereich des jeweiligen Hauptkapsidproteins und sorgt für starke laterale Interaktionen zwischen den einzelnen Hauptkapsidprotein-Monomeren während der Kapsidassemblierung (vgl. Abb. 40 und 41) (9, 38). Die untere Domäne besteht ebenfalls aus zwei nicht aufeinander folgenden Abschnitten der Primärsequenz (VP5 AS: 1 - 319/1056 - 1189; MCP AS: 1 - 308/1040 - 1176). Sie besteht zum großen Teil aus zwei langen und sieben kürzeren α -Helices. Bekannt ist, dass die langen α -Helices 1 und 2 mit den *scaffold*-Proteinen pPR und pAP (HSV-1: UL25, UL26.5; HCMV: UL80, UL80,5) sowie mit der unteren Domäne benachbarter VP5-Monomere interagieren (vgl. Abb. 40 und 41 C und A.1.5.3) (83, 347).

In einem nächsten Schritt konnten alle identifizierten AIC2- bzw. AIC3-Resistenz vermittelnden Aminosäuresubstitutionen der oberen bzw. mittleren Domäne von HCMV MCP zugeordnet werden (vgl. Abb. 40). Sieben davon liegen in der oberen (AS: D444N, A436D, Y522C, G525D, D563N, G568R und R583L) und weitere sieben in der mittleren Domäne (AS: N1184K, K1187N, C1198L, F1225L, C1315Y, K1318E, K1338N). Dabei sind die Aminosäuresubstitutionen der Virusstämme AIC2-R-7 (AS: Y522C/K1138E) und AIC2-R-13 (AS: D444N, G568R, C1198L), die mehr als eine Aminosäuresubstitution aufweisen, sowohl innerhalb der oberen als auch der mittleren Domäne des Proteins lokalisiert (vgl. Abb. 40).

C.8.3 Komparatives Modelling der oberen Domäne des HCMV Hauptkapsidproteins

Aufgrund der signifikanten Sequenzhomologie sowie der nahezu identischen Sekundärstruktur von VP5 und MCP ergab sich die Möglichkeit, ein komparatives Strukturmodell der oberen Domäne von MCP zu generieren, um mit dessen Hilfe die Position der AIC2- bzw. AIC3-Resistenz vermittelnden Aminosäuresubstitutionen zu ermitteln (9, 38). Dieses wurde, basierend auf dem Strukturmodell der oberen Domäne von VP5 (1NO7) (38), mit Hilfe des Computerprogramms UCSF Chimera (233) sowie dem damit verbundenen Modeller-*Interface* erstellt (vgl. Abb. 42) (103).

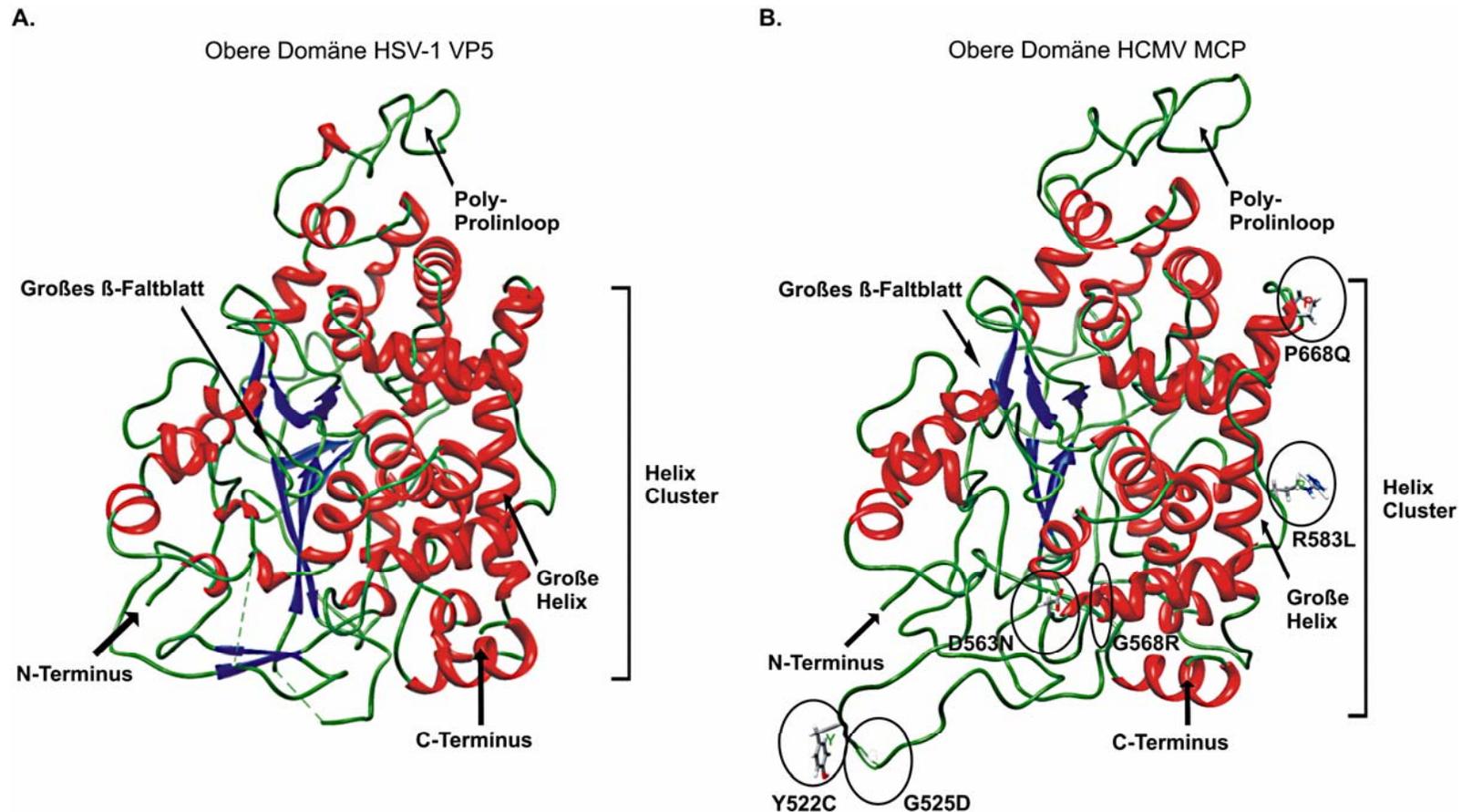


Abb. 42: Vergleich der Kristallstruktur der oberen Domäne von HSV-1 VP5 und des komparativen Strukturmodells der oberen Domäne von HCMV MCP

(A) 'Ribbon'-Darstellung der in 2,9 Ångström (Å) aufgelösten Struktur der oberen Domäne von VP5 (1NO7; VP5 AS-Sequenz: 451-1054) (38). Nicht aufgelöste Loop-Regionen werden durch gestrichelte Linien überbrückt.

(B) Mit Hilfe von komparativem Modelling ermittelte putative Struktur der oberen Domäne von HCMV MCP (AS: 474-1039). Die Positionen der potentiell AIC2- bzw. AIC3-Resistenz vermittelnden Punktmutationen sind in der 'ball and stick'-Darstellung gekennzeichnet.

α -Helices sind rot, β -Faltblätter blau und Loop-Strukturen grün koloriert. Die grundlegenden Strukturelemente sind entsprechend gekennzeichnet.

Wie erwartet, zeigt das komparative Strukturmodell der oberen Domäne von MCP eine zur oberen Domäne von HSV-1 vergleichbare Grundstruktur (vgl. Abb. 42). Charakteristisch ist ein Cluster von neun α -Helices auf der „rechten“ Seite der oberen Domäne des jeweiligen Proteins (vgl. Abb. 42 A und B). Die größte, 27 Å lange Helix besteht aus 24 (VP5) bzw. 23 Aminosäuren (MCP) und grenzt das Helixcluster rechtsseitig vollständig ab (vgl. Abb. 42) (9, 38). Die linksseitige Hälfte der oberen Domäne besteht sowohl bei VP5 als auch bei dem komparativen Modell von MCP aus exponierten Loop-Regionen und wird von β -Faltblattstrukturen und den restlichen α -Helices vervollständigt. Den apikalen Bereich der oberen Domäne beider Proteine bildet der hoch konservierte Poly-Prolinloop (VP5 AS: 862-880; MCP AS: 815-822) (38). Dieser ist sowohl bei HSV-1 als auch bei HCMV für die Bindung des *small capsid proteins* sowie für die Bindung von Tegumentproteinen essentiell (vgl. Abb. 40 und 42) (56, 288, 302, 337).

Mit Hilfe des komparativen Modells von HCMV MCP konnten die in der oberen Domäne vorhandenen AIC2- bzw. AIC3-Resistenz vermittelnden Aminosäuresubstitutionen einer putativen Tertiärstruktur zugeordnet werden. Es zeigte sich, dass diese an der Oberfläche des Proteins in drei unterschiedlichen Regionen lokalisieren (vgl. Abb. 42). Die UL86-P668Q- und die UL86-R583L-Aminosäuresubstitutionen befinden sich innerhalb des Helixclusters, während die UL86-D563N- und die UL86-G568R-Substitution in einer ebenfalls hoch konservierten Helix direkt daran angrenzen. Dagegen lokalisieren die UL86-Mutationen Y522C, G525D in einer an die mittlere Domäne angrenzenden, weniger konservierten Loop-Region (vgl. Abb. 42).

C.8.3.1 Vergleichende Analyse der Interaktionsdomäne der oberen HSV-1 VP5- und HCMV MCP-Domäne innerhalb der Hexon- und -Pentonkonformation

Die Lokalisation der resistenzvermittelnden Mutationen führte zu der Frage, inwieweit deren Position eine Stabilisierung der Hexon- und Pentonstrukturen und damit eine AIC2- bzw. AIC3-Resistenz ermöglicht. Daher wurde nachfolgend untersucht, ob die resistenzvermittelnden Aminosäuresubstitutionen innerhalb der Hexon- bzw. Penton-Interaktionsdomänen der MCP-Monomere lokalisiert sind. Hierfür wurden jeweils die Sequenzabschnitte der VP5-Penton- bzw. -Hexon-Interaktionsdomäne auf das komparative MCP-Modell übertragen, welches anschließend auf die VP5-Hexon-

bzw. Penton-Struktur gemodelt wurde (9, 38). Nachfolgend wurden die Positionen der Aminosäuren, die im Falle einer Substitution eine AIC2- bzw. AIC3-Resistenz vermitteln können, innerhalb des MCP-Modells markiert (vgl. Abb. 43 und 44).

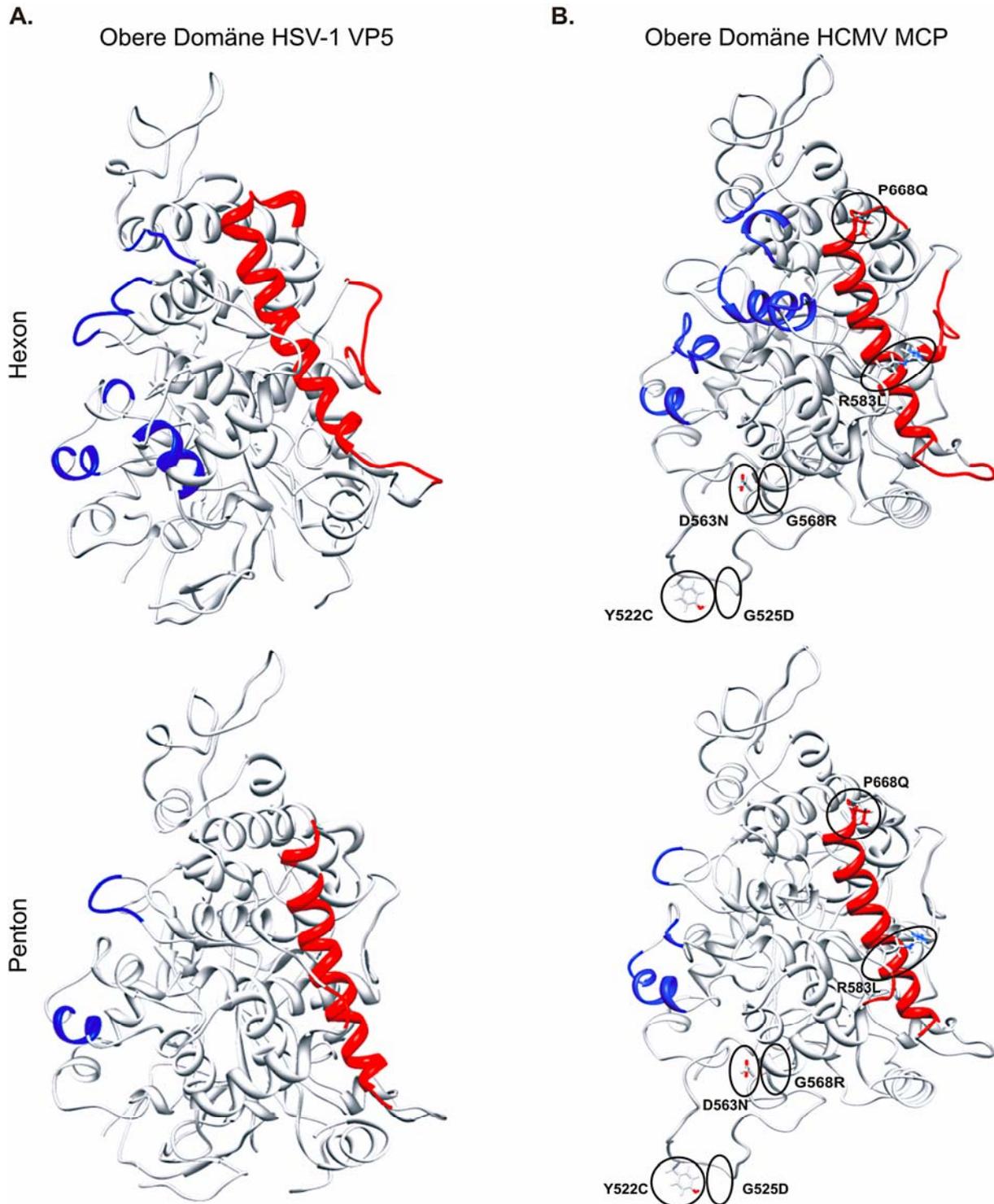


Abb. 43: Vergleich der Interaktionsdomänen der Kristallstruktur der oberen Domäne von HSV-1 VP5 und des komparativen Strukturmodells der oberen Domäne von HCMV MCP

Abb. 43: Fortgesetzt

(A) 'Ribbon'-Darstellung der mit 2.9 Å aufgelösten Struktur der oberen Domäne des HSV-1-Hauptkapsidproteins VP5 (AS: 451-1054) innerhalb der räumlichen Hexon- (oben) bzw. Pentonanordnung (unten). Die publizierten putativen Interaktionsdomänen der Hexon- bzw. Pentonmonomere sind rot und blau dargestellt (38).

(B) 'Ribbon'-Darstellung des anhand der oberen VP5-Domäne (1NO7) generierten Strukturmodells der oberen Domäne des HCMV-Hauptkapsidproteins MCP, innerhalb der räumlichen Hexon- (oben) bzw. Pentonanordnung (unten). Die zu den VP5-Interaktionsdomänen homologe Primärsequenz ist analog zu VP5 rot und blau dargestellt. Die Positionen der potentiell resistenzvermittelnden Aminosäuresubstitutionen sind in 'ball and stick'-Darstellung gekennzeichnet.

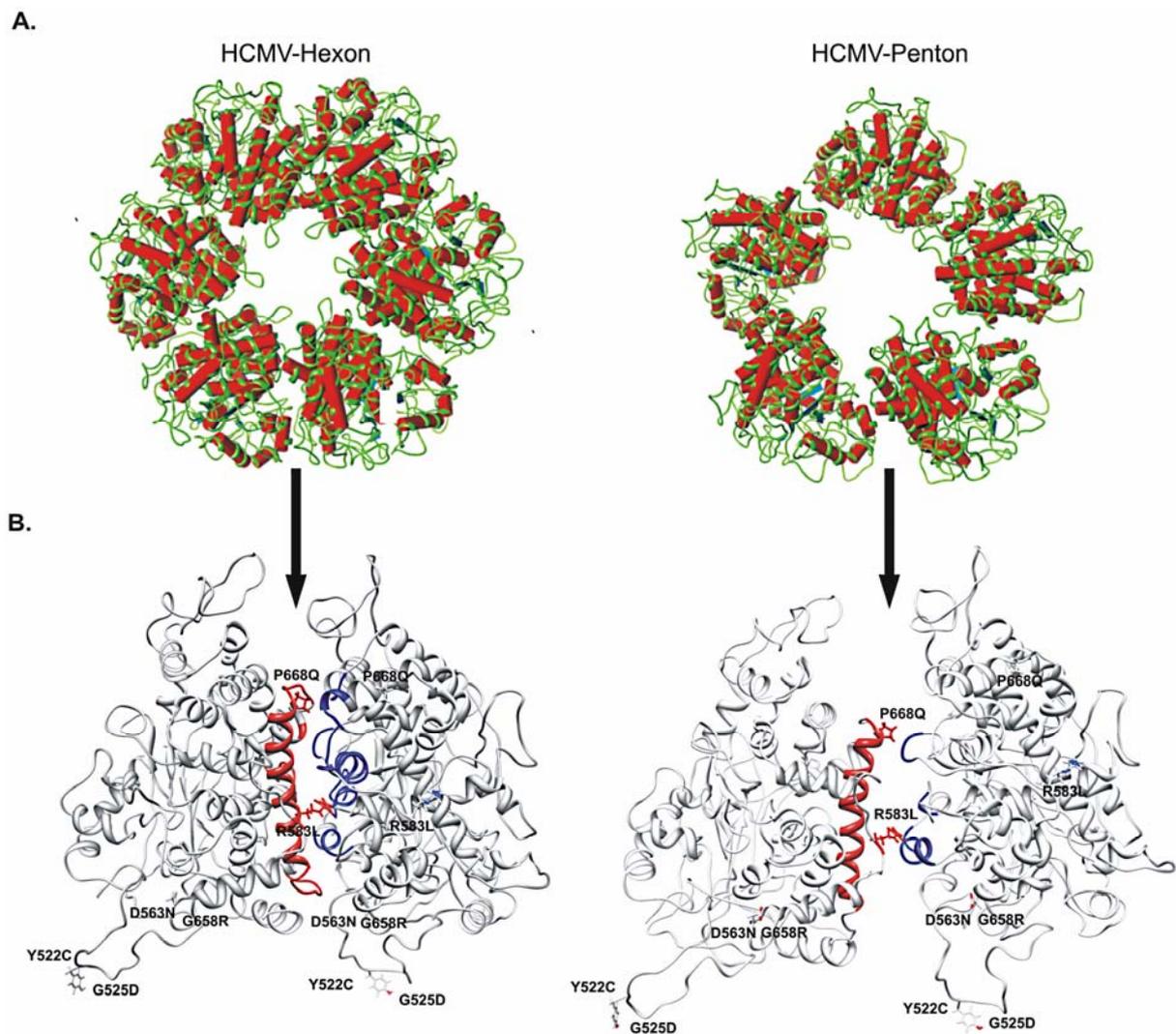


Abb. 44: Darstellung der putativen Interaktionsdomänen der oberen Domäne von MCP innerhalb der Hexon- bzw. Penton-Konformation

(A) Aufsicht auf die 'Pipes and Planks'-Darstellung des Hexon- bzw. Penton-Kapsomers des HCMV Nukleokapsids. Der im Vergleich kleinere Interaktionsbereich der MCP-Monomere innerhalb der Penton-Konformation ist deutlich zu erkennen (vgl. Pfeilmarkierung).

Abb. 44: Fortgesetzt

(B) 'Ribbon'-Darstellung der putativen Interaktion einzelner MCP-Monomere innerhalb des Hexon- (links) bzw. Penton-Kapsomers (rechts). Sowohl bei den Hexon- als auch bei den Pentonkapsomeren interagiert die dominante große Helix der oberen Domäne (rot) mit den Loop-Strukturen des angrenzenden Monomers (blau). Die Positionen der potentiell resistenzvermittelnden Aminosäuresubstitutionen sind in 'ball and stick'-Darstellung gekennzeichnet.

Die Analysen ergaben sowohl innerhalb des Hexon- als auch des Penton-Strukturmodells eine vergleichbare Anordnung der potentiellen Interaktionsdomänen beider Proteine (vgl. Abb. 43 und 44). Während in der Hexon- und der Penton-Konformation die exponierten Loop- und Helixregionen der „linken“ Seite der oberen Domäne ähnlich, aber nicht identisch sind, erweist sich der Interaktionsbereich des „rechtseitigen“ Helixclusters als nahezu deckungsgleich. Diese Beobachtung entspricht den Erwartungen, da die große Helix als Hauptinteraktionspartner der Hexon-Hexon- und Penton-Penton-Wechselwirkung bei Herpesviren hoch konserviert ist (vgl. Abb. 40, 42, 43 und 44) (9, 38).

Wie bei VP5 ist auch bei dem komparativen HCMV-MCP-Modell in der Hexon-Konformation der Bereich (vgl. Abb. 44, blau markiert), der mit dem Helixcluster des angrenzenden MCP-Monomers interagiert (vgl. Abb. 44, rot markiert), wesentlich größer. Dies ist auf die engere räumliche Anordnung der VP5- bzw. MCP-Monomere in der Hexon-Konformation zurückzuführen und vermittelt eine im Vergleich zur Pentonstruktur höhere Stabilität (vgl. Abb. 44) (9, 38, 46, 346).

C.8.3.2 Untersuchungen zur Lokalisation der resistenzvermittelnden**Aminosäuresubstitutionen innerhalb der Hexon- und Penton-Konformation**

Im Zuge der Charakterisierung der Hexon- bzw. Penton-Interaktionsdomänen stellte sich heraus, dass die Aminosäuresubstitutionen P668Q und R583L innerhalb des Helixclusters der oberen Domäne in der Interaktionsdomäne der Hexone bzw. Pentone lokalisieren (vgl. Abb. 44 und 45).

Mit dem hoch konservierten Helixbrecher Prolin an Position 668 beginnt innerhalb des Helixclusters die große Helix (vgl. Abb. 44 und 45). Eine Aminosäuresubstitution könnte hier eine abweichende Orientierung dieser Helix innerhalb des Helixclusters nach sich ziehen. Dies könnte einen stabilisierenden Effekt in Anwesenheit von AIC2 bzw. AIC3 verursachen und/oder zu einer Destabilisierung der Hexon- bzw. Pentonstruktur und damit zu einer Replikationsdefizienz führen. Die für die

Charakterisierung der UL86-P668Q Aminosäuresubstitution notwendigen Markertransfer-Analysen stehen jedoch noch aus. Daher kann zum jetzigen Zeitpunkt keine abschließende Aussage über die phänotypischen Eigenschaften dieser Mutation getroffen werden. Allerdings deuten die gewonnenen Erkenntnisse über die phänotypischen Auswirkungen der UL86-R583L-Mutation darauf hin, dass eine Aminosäuresubstitution innerhalb der Hexon- bzw. Penton-Interaktionsdomäne der großen Helix zu einer Destabilisierung der Hexon- und/oder Pentonstrukturen führt (vgl. Abb. 44 und 45). So vermittelt die UL86-R583L-Aminosäuresubstitution eine Replikationsdefizienz, die entweder durch die Zugabe von AIC2 bzw. AIC3 oder durch eine zusätzliche *rescue*-Mutation (MnCP-bp, nt: g539a, AS: G181E) kompensiert wird (vgl. Abb. 45 und C.7).

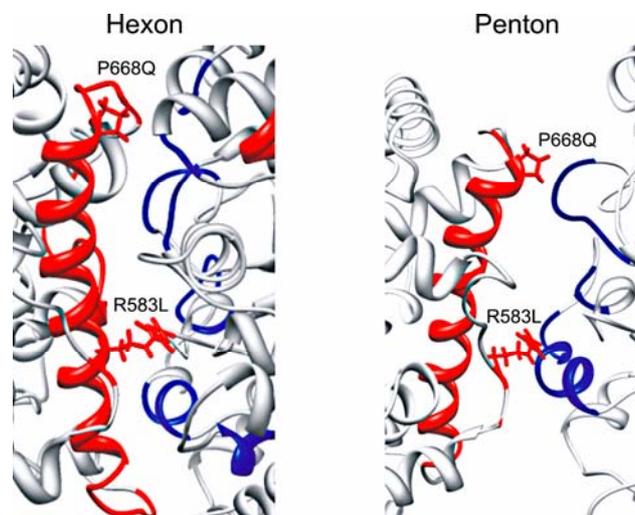


Abb. 45: Ausschnitt aus der putativen Interaktionsdomäne des Hexon- bzw. Penton-Kapsomers
Die Positionen der potentiell resistenzvermittelnden Aminosäuresubstitutionen sind in 'ball and stick'-Darstellung gekennzeichnet. Die putativen Interaktionsdomänen sind rot bzw. blau koloriert.

Neben den bereits beschriebenen, konnten vier weitere Aminosäuresubstitutionen innerhalb der oberen Domäne des komparativen MCP-Modells zugeordnet werden (AS: Y522C, G525D, D563N und G568R) (vgl. Abb. 42, 43 und 44). Diese lokalisieren in einer an die mittlere Domäne angrenzenden, teilweise hoch konservierten Helix- (D563N, G568R) bzw. einer weniger konservierten Loop-Region (Y522C, G525D) (vgl. Abb. 42, 43 und 44). Der Sequenzanalyse nach vermitteln sowohl die UL86-Y522C- als auch die UL86-G568R-Aminosäuresubstitution ihre AIC2-Resistenz nicht allein, sondern werden durch eine (AIC2-R-7, AS:

Y522C/K1138E) bzw. zwei (AIC2-R-13, AS: D444N, G568R, C1198L) weitere Mutationen in ihrer resistenzvermittelnden Wirkung unterstützt (vgl. Abb. 40 und Tab. 30). Mit Hilfe von Markertransfer-Analysen muss nachfolgend untersucht werden, inwieweit die Aminosäuresubstitutionen der mehrfach substituierten Virusstämme an der Vermittlung der Substanzresistenz beteiligt sind. Darüber hinaus ist aufgrund des unvollständigen Strukturmodells unklar, inwieweit die singuläre UL86-Aminosäuresubstitution G525D, deren AIC2/AIC3-Kreuzresistenz vermittelnde Eigenschaft bestätigt wurde, bzw. die UL86-Aminosäuresubstitution D563N ihre resistenz- bzw. putativ resistenzvermittelnde Wirkung induziert.

8.3.3 Analysen zur Lokalisation AIC2- bzw. AIC3-Resistenz vermittelnder Aminosäuresubstitutionen innerhalb der mittleren Domäne von HCMV MCP

Für die mittlere Domäne von HSV-1 VP5 existiert kein auf Röntgenstrukturanalyse bzw. NMR-Spektroskopie basierendes Strukturmodell. Aufbauend auf der hohen VP5/MCP-Sequenzhomologie (36% identische und 17% strukturell homologe AS) sowie der nahezu identischen Sekundärstruktur ist jedoch anzunehmen, dass die meisten resistenzvermittelnden Aminosäuresubstitutionen innerhalb der hoch konservierten α -Helices vorliegen (N1184K, K1187N, F1225L, C1315Y) bzw. unmittelbar daran angrenzen (K1338N, K1318E) (vgl. Abb. 40 und 41). Lediglich die Aminosäuresubstitution C1198L grenzt unmittelbar an einen hoch konservierten prolin- und argininreichen Abschnitt der Primärsequenz (AS: 1189 - 1197) (vgl. Abb. 40).

Bei näherer Betrachtung zeigte sich, dass die Aminosäuresubstitutionen der mittleren Domäne elektrostatische Wechselwirkungen (N1184K, K1187N, K1338N, K1338E), kovalente Bindungen (C1198L, C1315Y) oder hoch konservierte hydrophobe Wechselwirkungen (F1225L) modifizieren können (vgl. Abb. 40 und 41). Zu vermuten ist, dass hierüber im Einzelfall α -helikale Strukturen verändert werden, die zu der jeweiligen Substanzresistenz führen. Inwieweit sich die Aminosäuresubstitution C1315Y, die als einzige Mutation ausschließlich eine AIC2-Resistenz vermittelt, von den anderen resistenzvermittelnden UL86-Mutationen der mittleren Domäne unterscheidet, bleibt ungeklärt.

Zusammengefasst konnten mit Hilfe der komparativen Strukturanalyse die AIC2- bzw. AIC3-Resistenz vermittelnden Aminosäuresubstitutionen der oberen und

mittleren Domäne des HCMV-Hauptkapsidproteins zugeordnet werden. Die in der oberen Domäne befindlichen Aminosäuresubstitutionen lokalisieren in drei unterschiedlichen Regionen und weisen eine zur Oberfläche des Proteins gerichtete Position auf. Daher besteht die Möglichkeit, dass die jeweiligen Mutationen in Anwesenheit von AIC2 bzw. AIC3 über eine Interaktion mit benachbarten MCP-Monomeren zu einer Stabilisierung der Penton- bzw. Hexon-Strukturen beitragen. Eine Zuordnung der AIC2- bzw. AIC3-Resistenz vermittelnden Aminosäuresubstitutionen in die Tertiärstruktur der mittleren Domäne von HCMV MCP konnte aufgrund eines fehlenden Strukturmodells nicht durchgeführt werden.

D. Diskussion

Das humane Cytomegalovirus ist ein wichtiges Pathogen mit klinischer Relevanz bei Patienten mit supprimiertem oder geschwächtem Immunsystem sowie bei Neugeborenen. Alle bisher gegen HCMV zugelassenen Medikamente inhibieren die virale DNA-Polymerase und sind mit schwerwiegenden Toxizitäts- und Resistenzproblematiken verbunden. Deshalb ist die Entwicklung potenter antiviraler Substanzen mit neuartigen Wirkmechanismen dringend erforderlich.

Hochdurchsatzscreenings identifizierten drei neuartige, chemisch verschiedene niedermolekulare Substanzklassen mit antiviraler Wirksamkeit gegen HCMV. Die nachfolgenden Leitstrukturoptimierungen führten zu den Entwicklungskandidaten AIC246 (Letermovir), AIC2 und AIC3, die sich aufgrund ihrer hervorragenden präklinischen Daten in der klinischen Entwicklung befinden (nur veröffentlicht für AIC246) (153, 166, 178, 193). In einer kürzlich abgeschlossenen Phase-IIb-Studie hat AIC246 eine hervorragende Wirksamkeit sowie Verträglichkeit als Medikament zur Prophylaxe einer HCMV-Infektion in knochenmarktransplantierten Patienten bewiesen und beide Endpunkte der klinischen Studie erreicht (3).

Gegenstand der vorliegenden Ausführungen war es, die antiviralen Wirkmechanismen dieser drei unterschiedlichen Substanzen zu analysieren und zu charakterisieren.

Time-of-Addition-Analysen deuteten schon zu Beginn darauf hin, dass alle drei niedermolekularen HCMV-Substanzen ihre inhibitorische Wirkung in der späten Phase des viralen Replikationszyklus entfalten. Bestätigt wurde diese Hypothese durch die Beobachtung, dass AIC246, AIC2 und AIC3 die Synthese der viralen DNA nicht beeinträchtigen, was zudem verdeutlicht, dass sich die Wirkmechanismen der neuartigen HCMV-Inhibitoren von dem Wirkmechanismus aller bisher zugelassenen Anti-HCMV-Medikamente unterscheiden (6, 200). Darüber hinaus zeigten sämtliche rekombinante UL56- und UL86-Virusmutanten eine zum Wildtyp vergleichbare GCV-Suszeptibilität, was als weiterer Beweis für einen von den Polymeraseinhibitoren abweichenden inhibitorischen Wirkmechanismus dieser drei Substanzen gewertet

Diese liegen mit Ausnahme der AS-Position 369 weder in einer bei Herpesviren hoch konservierten, noch in einer der bei HCMV vorhandenen hypervariablen Region bzw. konnten keinem der funktionellen Bereiche der pUL56-Primärsequenz zugeordnet werden (vgl. Abb. 46) (51). Von den funktionellen Bereichen wird angenommen, dass sie für die Faltung von pUL56 (Glycin- Serin-reiche flexible Regionen (GS)), für eine Interaktion mit der kleinen Terminaseuntereinheit pUL89 (Leuzin-Zipper-Motive (LZ)) bzw. für die Bindung und Prozessierung der viralen konkatemeren DNA (Zink-Finger-Motiv (ZF)) benötigt werden (vgl. Abb. 46) (51).

Interessanterweise wurden für den Sequenzabschnitt, in dem die AIC246-induzierten Mutationen vorliegen, keine Resistenzen für die Terminaseinhibitoren BDCRB (Q204R) bzw. Bay 38-4766 (A662V) beschrieben (vgl. Abb. 46 und A.3.4.1) (45, 98, 169). So ist die BDCRB-Resistenzmutation Q204R in dem hoch konservierten Zinkfinger-Motiv (ZF) lokalisiert (51, 169). Dagegen befindet sich die Bay 38-4766-Resistenzmutation - wie die meisten AIC246-Resistenzmutationen - weder in einer bei Herpesviren hoch konservierten Region noch in einer der bei HCMV hypervariablen bzw. funktionellen Regionen der großen Terminaseuntereinheit (vgl. Abb. 46) (45, 51).

Die unterschiedlichen Positionen der AIC246-, BDCRB- bzw. Bay 38-4766 resistenzvermittelnden Mutationen könnten bedeuten, dass die unterschiedlichen Substanzen - trotz einer vergleichbaren Inhibition der Prozessierung und Verpackung der viralen genomischen DNA - mit voneinander abweichenden Domänen der großen Terminaseuntereinheit interagieren. Dafür spricht auch, dass keine BDCRB/Bay 38-4766-Kreuzresistenz beschrieben wurde (45, 169, 260, 313). Darüber hinaus konnten sowohl in Bay 38-4766- als auch in BDCRB-resistenten Viren in der kleinen Terminaseuntereinheit pUL89 Resistenzmutationen nachgewiesen werden, wogegen AIC246-resistente Viren ausschließlich in pUL56 Resistenzmutationen aufweisen (45, 117, 169, 260, 313). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass sich AIC246, Bay 38-4766 und BDCRB in ihrer jeweiligen molekularen Wechselwirkung mit pUL56 bzw. in ihrer jeweiligen Interaktion mit dem gesamten Terminasekomplex voneinander unterscheiden.

Markertransfer-Analysen bestätigten, dass die in der großen Terminaseuntereinheit identifizierten Aminosäuresubstitutionen UL56-R369S, -L241P bzw. -C325Y eine AIC246-Resistenz vermitteln. Die rekombinanten UL56-Virusmutanten zeigten dabei ein zum Wildtypvirus RV-HG vergleichbares Wachstum, was bedeutet, dass die

insetierten Aminosäuresubstitutionen die Virusreplikation in Zellkultur nicht beeinträchtigen. Allerdings ist diese Beobachtung nicht notwendigerweise auf die Dynamik der HCMV-Replikation *in vivo* übertragbar, da sich diese *im Patienten* grundlegend von der HCMV-Replikation in *Zellkulturexperimenten* unterscheidet (96, 97).

Die Beobachtungen, dass keine der rekombinanten AIC246-resistenten Virusmutanten eine Kreuzresistenz zu BDCRB zeigte und dass nur RV-HG-UL56-C325Y - die Virusmutante mit der höchsten AIC246-Resistenz (11000-fach) - eine schwache Bay 38-4766-Kreuzresistenz (vierfach) aufweist, deuten zusätzlich darauf hin, dass sich die inhibitorische Wirkung von AIC246 auf molekularer Ebene von BDCRB und Bay 38-4766 unterscheidet. Weitere Markertransfer-Analysen sind erforderlich, um diese Theorie zu untermauern und um zu prüfen, ob auch andere putativ AIC246-Resistenz vermittelnde Aminosäuresubstitutionen eine Kreuzresistenz vermitteln.

Eine Lokalisation der AIC246-Resistenz vermittelnden Aminosäuresubstitutionen innerhalb der Tertiärstruktur der großen Terminaseuntereinheit könnte zusätzlich Anhaltspunkte liefern, inwieweit AIC246, Bay 38-4766 und BDCRB in ihrem molekularen Wirkmechanismus voneinander abweichen. Dies ist allerdings zur Zeit noch nicht möglich, da bisher weder für HCMV pUL56 noch für eine andere herpesvirale große Terminaseuntereinheit ein Strukturmodell publiziert wurde.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Analysen zum AIC246-Wirkmechanismus deuten darauf hin, dass AIC246 mit der Verpackung der viralen genomischen DNA in das Nukleokapsid interferiert. Dies konnte in parallel laufenden Experimenten, die in der Arbeitsgruppe durchgeführt wurden und nicht Teil dieser Arbeit sind, bestätigt werden. So zeigten Southern Blot Analysen, dass AIC246 ähnlich wie Bay 38-4766 und BDCRB die terminasevermittelte Prozessierung der viralen Genomkonkatemere zu Genommonomeren inhibiert (117, 198, 244, 313). Jedoch stimmt diese Beobachtung nicht exakt mit der TEM-Analyse HCMV-infizierter, AIC246-behandelter HFF-Zellen überein, was möglicherweise auf eine partiell unspezifische Hybridisierung der Southern Blot Sonde zurückzuführen ist (vgl. C.4) (117). So war zwar die Menge an DNA-haltigen C-Kapsiden in Anwesenheit von AIC246 signifikant reduziert (vgl. Tab. 26), aber es konnten vereinzelt immer noch C-Kapsid-artige Partikel entdeckt werden (vgl. Abb. 25, b). Würde AIC246 die Prozessierung der

konkatemeren genomischen DNA vollständig inhibieren, könnten sich keine C-Kapsid-artigen Strukturen bilden und es wären ausschließlich virale A- bzw. B-Kapside zu beobachten. In Verbindung mit der AIC246-vermittelten Inhibition des nukleären *egress* wird daher angenommen, dass die C-Kapsid-artigen Partikel kein vollständiges Genom enthalten. Ein vergleichbares Phänomen wurde auch für den inhibitorischen Effekt von BDCRB beschrieben (198, 222). So wurde gezeigt, dass BDCRB größtenteils die terminasevermittelte Prozessierung der viralen Genomkonkatemere zu reifen Genommonomeren inhibiert (198, 222). Zusätzlich wird jedoch eine geringe Menge von in der U_L-Region terminal trunkierten Genommonomeren prozessiert und in das Nukleokapsid verpackt (vgl. Abb. 2 und 7) (198, 222). Die Reifung dieser C-Kapsid-artigen Partikel ist jedoch unterbunden, weshalb sie nicht den nukleären *egress* durchlaufen und im Zellkern verbleiben (198, 222). Darüber hinaus ist in Anwesenheit von BDCRB - wie auch von AIC246 - die Produktion von *dense bodies* nicht beeinträchtigt, was zusätzlich auf einen vergleichbaren inhibitorischen Wirkmechanismus hindeuten kann (138, 198, 222).

Basierend auf den bisherigen Daten kann daher keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden, ob AIC246 die Prozessierung der Genomkonkatemere *vollständig inhibiert*, zu einer *teilweisen Trunkierung* der Genommonomere führt oder seine antivirale Wirkung über eine *Kombination beider Prozesse* vermittelt. Zusätzliche Analysen zur Prozessierung der viralen genomischen konkatemeren DNA - zum Beispiel über die *Pulsed-Field-Gelelektrophorese* - könnten zeigen, inwieweit sich AIC246 in seiner inhibitorischen Wirkung von Bay 38-4766 und BDCRB unterscheidet.

Die Analyse der inhibitorischen Aktivität von AIC2 und AIC3 in *Time-of-Addition*-Experimenten deutete schon frühzeitig darauf hin, dass AIC2 und AIC3 - wie AIC246 - in der späten Phase des HCMV-Replikationszyklus wirken. Die Beobachtung, dass AIC2 und AIC3 eine identische und im Vergleich zu AIC246 verschiedene Kinetik aufweisen, führte jedoch zur Vermutung, dass sich deren antivirale Aktivität von der von AIC246 unterscheidet. Unterstützt wurde diese Annahme durch die Analysen zur viralen Genexpression, bei denen - im Gegensatz zu AIC246 - in Anwesenheit von AIC2 bzw. AIC3 eine Akkumulation sowie eine intranukleäre Aggregation von

L-Proteinen beobachtet wurden. Bestätigt wurde diese Hypothese durch TEM-Analysen, da hier in Anwesenheit von AIC2 und AIC3 schwer deformierte, ringförmige Nukleokapsidstrukturen innerhalb des Zellkerns beobachtet werden konnten. Dabei deuteten die ringförmige Struktur sowie die auf deren Innenseite lokalisierten *scaffold*-Proteine darauf hin, dass die für die Assemblierung des Prokapsids essentiellen L-Strukturproteine innerhalb dieser aberranten Strukturen lokalisieren. Aufbauend auf dieser Beobachtung ist anzunehmen, dass AIC2 bzw. AIC3 ihren inhibitorischen Effekt während der Bildung des transienten Prokapsids vermitteln. Diese Vermutung würde erklären, weshalb in den *Time-of-Addition*-Experimenten AIC2 und AIC3 ihre antivirale Wirkung zeitgleich und vor AIC246 entfalten, da die Assemblierung des viralen Prokapsids vor der Prozessierung und Verpackung der viralen genomischen DNA erfolgt (112, 270, 271).

Bemerkenswerterweise scheint die Inhibition des nukleären *egress* allein nicht zu der Akkumulation viraler L-Strukturproteine beizutragen (vgl. Abb. 19 A - C), da dieser Effekt in Anwesenheit von AIC246, das ebenfalls das Ausschleusen von Kapsiden aus dem Zellkern verhindert, nicht zu beobachten ist. Eine Hypothese ist, dass die in der TEM-Analyse festgestellten AIC2- bzw. AIC3-vermittelten aberranten Nukleokapsidstrukturen die Regulation der L-Genexpression modifizieren und zu einer erhöhten Expression von L-Strukturgenen führen. Eine quantitative Analyse der MCP- oder SCP-mRNA-Expression in Anwesenheit von Substanz könnte hierüber Aufschluss geben.

Im Kontext der Analyse des inhibitorischen Wirkmechanismus von AIC2 und AIC3 ist die Assemblierung des Prokapsids und insbesondere die ordnungsgemäße Struktur der aus dem Hauptkapsidprotein MCP gebildeten Penton- und Hexonmonomere sowie die stabilisierende Wirkung der Triplexen, bestehend aus dem *minor capsid*- und dem *minor capsid binding protein*, von Bedeutung (46, 133, 159, 219, 310). Die aberranten prokapsidartigen Strukturen lassen vermuten, dass AIC2 und AIC3 mit den Penton- bzw. Hexonkapsomeren oder mit den Triplexen interferieren. Hier könnten weitere, jedoch hochauflösende TEM-Analysen, die insbesondere die Penton- und Hexonstruktur sowie die Interaktion der Triplexen mit den Pentonen und Hexonen analysieren, zu einer präziseren Charakterisierung des AIC2- bzw. AIC3-Wirkmechanismus beitragen.

Für HSV-1 konnte mittels hochauflösender TEM-Analysen gezeigt werden, dass eine Koexpression von L-Strukturproteinen eine virus-unabhängige Assemblierung B-Kapsid-artiger Strukturen induziert (312). Übertragen auf HCMV stellt sich die Frage, inwieweit in einem vergleichbaren Experiment B-Kapsid-artige Strukturen gebildet werden und ob in Anwesenheit von AIC2 bzw. AIC3 - statt B-Kapsid-artiger Strukturen - aberrante Nukleokapsidstrukturen zu beobachten sind. Auf diese Weise könnte gezeigt werden, dass die Substanzen mit den viralen Strukturproteinen interagieren und die korrekte Ausbildung der Nukleokapsidstruktur verhindern.

Die Theorie, dass AIC2 und AIC3 mit der Assemblierung des viralen Nukleokapsids interferieren, passt zu der Charakterisierung der AIC2- bzw. AIC3-resistenten Virusstämme. Diese wiesen nicht nur eine AIC2/AIC3-Kreuzresistenz auf, was mit der vergleichbar aberranten Morphologie der Nukleokapsidstrukturen in Anwesenheit von Substanz vereinbar ist, sondern zeigten, dass alle Mutationen, die eine AIC2- bzw. AIC3-Resistenz induzieren, ausschließlich innerhalb des Hauptkapsidproteins MCP lokalisieren.

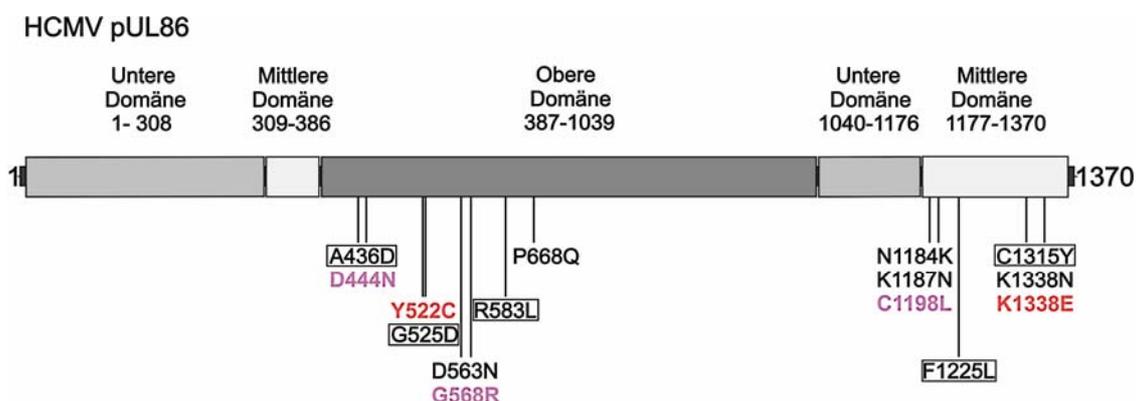


Abb. 47: Lokalisation der AIC2- bzw. AIC3-Resistenzmutationen innerhalb des HCMV-Hauptkapsidproteins MCP

Die obere Domäne ist dunkelgrau, die mittlere weiß und die untere hellgrau unterlegt. Die AIC2- bzw. AIC3-Resistenz vermittelnden Aminosäuresubstitutionen sind entsprechend markiert. Schwarz: Singuläre in den AIC2- bzw. AIC3-resistenten Virusstämmen detektierte Aminosäuresubstitutionen. Lila: Virusstamm AIC2-R-13 mit drei Aminosäuresubstitutionen. Rot: Virusstamm AIC2-R-7 mit zwei Aminosäuresubstitutionen. Aminosäuresubstitutionen, deren resistenzvermittelnde Eigenschaft mittels Markertransfer-Analyse bestätigt wurden, sind mit einem Rahmen versehen. Verändert nach (9)

Wie bereits bei AIC246 konnten auch hier Markertransfer-Analysen bestätigen, dass singuläre Aminosäuresubstitutionen, abhängig von ihrer Art und Position,

voneinander abweichende AIC2- bzw. AIC3-Suszeptibilitäten vermitteln. Auch hier zeigten - bis auf eine - alle rekombinanten Virusmutanten ein zum Wildtypvirus RV-HG vergleichbares Wachstum, was darauf hindeutet, dass die inserierten Aminosäuresubstitutionen die Virusreplikation in Zellkultur nicht beeinträchtigen. Allerdings ist diese Beobachtung, wie schon bei AIC246-resistenten rekombinanten Virusmutanten, auch nicht notwendigerweise auf die Dynamik der HCMV-Replikation *in vivo* übertragbar (96, 97). Bis auf eine Aminosäuresubstitution zeigten sämtliche rekombinanten Virusmutanten eine AIC2/AIC3-Kreuzresistenz, was als Indiz dafür gewertet werden kann, dass das Zielprotein und die Bindedomäne von AIC2 und AIC3 identisch sind, obwohl es sich um chemisch verschiedene Substanzklassen handelt. Die Beobachtung, dass die UL86-C1315Y-Aminosäuresubstitution keine AIC2/AIC3-Kreuzresistenz vermittelt, lässt jedoch vermuten, dass die molekularen Wirkmechanismen beider Substanzen zu einem bestimmten Grad voneinander abweichen.

Sämtliche rekombinanten UL86-Virusmutanten zeigten keine GCV- und darüber hinaus auch keine AIC246-, BDCRB- oder Bay 38-4766-Kreuzresistenz. Daraus wird geschlossen, dass AIC2 und AIC3 einen für Herpesviren völlig neuartigen inhibitorischen Wirkmechanismus aufweisen, der sich von den Polymerase- und Terminaseinhibitoren abgrenzt.

Eine Ausnahme bei der Phänotypisierung der rekombinanten UL86-Virusmutanten bildete die Virusmutante RV-HG-UL86-R583L. So zeigte sich, dass die R583L-Substitution zu einem Wachstumsdefekt führt, der durch die Zugabe von AIC2 bzw. AIC3 vollständig kompensiert werden konnte. Dabei konnten in Anwesenheit von AIC3 im Vergleich zu AIC2 größere Virusplaques beobachtet werden. Dies erhärtet zusätzlich die Annahme, dass die neuartigen Substanzen ihren inhibitorischen bzw. stabilisierenden Effekt auf eine vergleichbare, aber nicht identische Weise vermitteln (vgl. Abb. 36). Zusätzliche Replikationsanalysen in An- oder Abwesenheit von AIC2 bzw. AIC3 könnten zu einem besseren Verständnis des stabilisierenden bzw. inhibitorischen Effekts dieser Substanzen beitragen.

Interessanterweise konnte eine replikationskompetente UL86-R583L *rescue*-Mutante (RV-HG-UL86-R583L Klon 2) isoliert werden. Deren Phänotypisierung zeigte eine im Vergleich zum Wildtyp RV-HG um eine Log-Stufe reduzierte Virusreplikation. In

Anwesenheit von AIC2 war diese allerdings mit RV-HG vergleichbar. Daraus wird geschlossen, dass die unbekannt *rescue*-Mutation die UL86-R583L-vermittelte Replikationsdefizienz nur *teilweise* kompensieren kann. Eine vollständige Genomanalyse (*deep sequencing*) der beiden rekombinanten RV-HG-UL86-R583L Virusmutanten, verbunden mit einem Sequenzvergleich, führte bei der UL86-R583L-*rescue*-Mutante zu der Detektion eines Aminosäure-Polymorphismus innerhalb des *minor capsid binding proteins* (pUL46; nt: g539a; AA: G181E). Die Aminosäuresubstitution im MnCP-bp führte zu einer Theorie, die erklären kann, warum RV-HG-UL86-R583L Klon 2 auch in Abwesenheit von AIC2 bzw. AIC3 repliziert. So bildet das MnCP-bp mit zwei MnCP-Monomeren ein Trimer (Triplex), welches die einzelnen Hexon-Hexon und Hexon-Penton-Protomere miteinander verbindet (vgl. Abb. 48) (46, 56). Während dieses Prozesses interagieren bei HSV-1 und HCMV die beiden MnCP-Monomere mit der unteren Domäne und das MnCP-bp mit der mittleren Domäne des Hauptkapsidproteins (46, 56, 114, 159, 254). Diese Wechselwirkung der Triplexe ist dabei für die Stabilisierung des viralen Prokapsids sowie für die Angularisierung und Ausbildung der ikosaedrischen Struktur des Nukleokapsids essentiell (vgl. Abb. 48) (56). Eine plausible, theoretische Annahme bestünde darin, dass die UL86-R583L-Substitutionen die Penton- bzw. Hexon-Strukturen destabilisieren, was wiederum durch die MnCP-bp-G181E-Substitution innerhalb der Triplexe in Abwesenheit von Substanz kompensiert wird. Dies wiederum könnte bedeuten, dass die G181E-Substitution des *minor capsid proteins* nur die sekundäre Penton- bzw. Hexon-Modifikation ausgleicht und nicht notwendigerweise mit dem molekularen Wirkmechanismus von AIC2 bzw. AIC3 in Verbindung steht. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Beobachtung, dass bei keinem AIC2- bzw. AIC3-resistenten Virusstamm eine Aminosäuresubstitution innerhalb des MnCP bzw. MnCP-bp detektiert wurde.

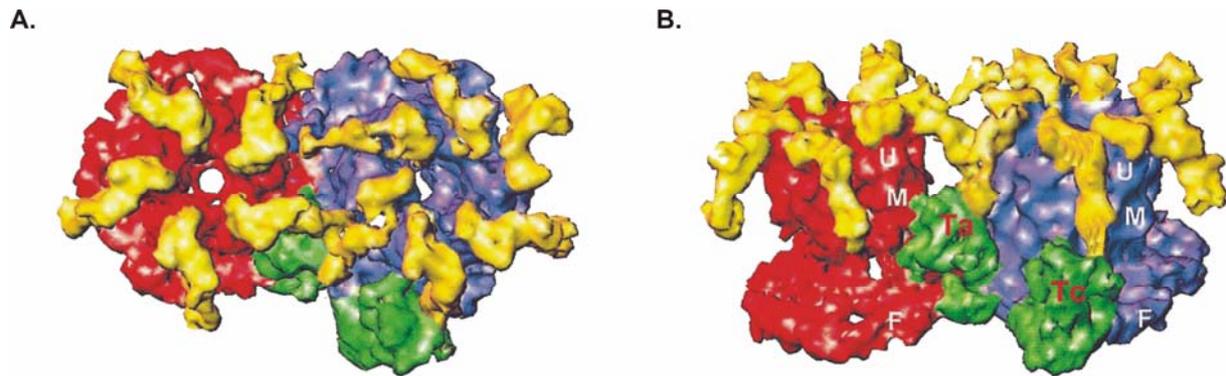


Abb. 48: Interaktion der Triplexe mit den Hexonen und Pentonen des HCMV-Nukleokapsids

Auf- (A) und Seitenansicht (B) auf die Interaktion eines Penton- (rot) und Hexonkapsomers (blau). Die Triplexe (Ta und Tc, grün), bestehend aus zwei Kopien des *minor capsid proteins* und einer Kopie des *minor capsid binding proteins*, verbinden das Hexon- mit dem Pentonmonomer über die untere (*floor*, F) und mittlere (*middle*, M) Domäne des jeweiligen MCP-Monomers. Die mit der oberen MCP-Domäne (*upper*, U) sowie mit der oberen Domäne der Triplexe interagierenden Tegumentproteine sind gelb dargestellt. Verändert nach (56)

Die hypothetischen Auswirkungen, der durch die *deep-sequencing*-Sequenzanalyse identifizierten Punktmutation im MnCP-bp, müssen nachfolgend durch Markertransfer-Analysen bestätigt werden. So ist zu klären, inwieweit die MnCP-bp-G181E-Aminosäuresubstitution die UL86-R583L-vermittelte Replikationsdefizienz kompensiert bzw. zu einer möglichen AIC2- bzw. AIC3-Resistenz führt.

Im Zuge der weiteren Charakterisierung des molekularen Wirkmechanismus von AIC2 bzw. AIC3 stellte sich die Frage, ob die Positionen der jeweiligen resistenzvermittelnden Aminosäuresubstitution - und insbesondere die Position der UL86-R583L-Substitution innerhalb des HCMV-Hauptkapsidproteins - Rückschlüsse auf den molekularen Wirkmechanismus dieser Substanzen zulassen. Da für das HCMV-Hauptkapsidprotein kein Strukturmodell existiert, aber für das strukturell homologe HSV-1 Hauptkapsidprotein VP5 ein Röntgenstrukturmodell der oberen Domäne vorliegt, wurde ein komparatives Strukturmodell generiert, um die AIC2 bzw. AIC3-Resistenz vermittelnden Aminosäuresubstitutionen innerhalb einer putativen MCP-Tertiärstruktur zuordnen zu können.

Es zeigte sich, dass die innerhalb des komparativen Strukturmodells lokalisierten AIC2- bzw. AIC3-Resistenz vermittelnden Aminosäuresubstitutionen eine zur Oberfläche gerichtete Position aufweisen. Daher besteht die Möglichkeit, dass in

Anwesenheit von Substanz die jeweiligen Mutationen über eine Interaktion mit angrenzenden MCP-Monomeren zu einer Stabilisierung der Penton- bzw. Hexon-Strukturen beitragen. Bemerkenswerterweise lokalisieren die Aminosäuresubstitutionen P668Q und R583L innerhalb der Interaktionsdomäne der oberen Domäne, welche von der bis an die mittlere Domäne angrenzenden großen Helix dominiert wird. Wie schon erwähnt, führt die R583L-Substitution zu einem Replikationsdefekt, der entweder durch Substanz oder mittels einer *rescue*-Mutation ausgeglichen wird. Deren Lokalisation auf der mittleren Höhe der großen Helix führte zu der Hypothese, dass die R583L-Substitution die Interaktionsdomäne der oberen Domäne destabilisiert und so den Replikationsdefekt induziert. Ebenso könnte eine Substitution des Helixbrechers Prolin an Position 668 die Struktur der großen Helix und damit die Interaktionsdomäne der oberen Domäne verändern. Daher muß auch hier die Möglichkeit eines P668Q-vermittelten Replikationsdefekts, der durch Substanz kompensiert werden kann, in Betracht gezogen werden. Zur Bestätigung dieser Hypothese ist allerdings eine weitere Markertransfer-Analyse erforderlich.

Die kreuzresistenzvermittelnde Eigenschaft der singulären G525D-Substitution konnte anhand von Markertransfer-Analysen bestätigt werden, während die Charakterisierung der singulären D563N-Substitution noch aussteht. Aufgrund der im Vergleich zum Helixcluster niedrigen Konservierung der Loop-Region, in welcher die G525D-Substitution lokalisiert ist, kann jedoch keine Aussage über deren strukturelle Auswirkung getroffen werden. Inwieweit die Aminosäuresubstitutionen Y522C und G568R ihre Resistenz allein oder in Verbindung mit den in der mittleren Domäne lokalisierten Mutationen K1338E bzw. D444N und C1198L vermitteln, muss ebenfalls noch durch Markertransfer-Analysen untersucht werden. Dabei ist zu klären, ob die Insertion von multiplen Aminosäuresubstitutionen zu additiven Effekten bezüglich der jeweiligen Substanz-Suszeptibilität führt.

Die Bewertung der Qualität des komparativen MCP-Modells basiert auf verschiedenen Faktoren. Zum einen sind die Nukleokapsidstrukturen sowie die Hexon- und Pentonstrukturen von HSV-1 und HCMV miteinander vergleichbar, was auf eine identische Funktion beider Proteine hinweist; zum anderen besitzen HSV-1 VP5 und HCMV MCP einen hohen Anteil identischer und strukturell homologer Aminosäuren sowie eine nahezu identische Sekundärstruktur. Daher ist davon auszugehen, dass beide Proteine eine vergleichbare Tertiärstruktur aufweisen (9, 38,

64, 74, 170). Zwar zeigt das komparative Strukturmodell der oberen Domäne mit 20.1% eine im Vergleich niedrige Zahl an identischen Aminosäuren. Diese befinden sich jedoch größtenteils innerhalb hoch konservierter α -Helices und Loop-Regionen, die für die Interaktion der einzelnen MCP-Monomere innerhalb der Hexon- und Penton-Strukturen entscheidend sind (9, 38). Daher ist davon auszugehen, dass das komparative MCP-Modell als vorläufig akzeptable Darstellung der oberen Domäne des HCMV-Hauptkapsidproteins gelten kann, und dass die räumliche Zuordnung der resistenzvermittelnden Aminosäuresubstitutionen innerhalb der hoch konservierten Regionen in großen Teilen zutrifft.

Eine Zuordnung der AIC2- bzw. AIC3-Resistenz vermittelnden Aminosäuresubstitutionen in die Tertiärstruktur der mittleren Domäne von HCMV MCP konnte aufgrund eines fehlenden Modells nicht durchgeführt werden. Daher ist unklar, wie die Aminosäuresubstitutionen der mittleren Domäne ihre Resistenz vermitteln und wie sich die in der mittleren Domäne lokalisierte Aminosäuresubstitution UL86-C1315Y, die bisher als einzige Substitution ausschließlich eine AIC2-Resistenz vermittelt, von den kreuzresistenzinduzierenden Aminosäuresubstitutionen unterscheidet.

Weitere Strukturanalysen könnten eine *direkte* Interaktion von AIC2 bzw. AIC3 mit dem Hauptkapsidprotein nachweisen. Da die obere Domäne des HSV-1-Proteins VP5 kristallisiert wurde, besteht die Möglichkeit, dass die obere Domäne von HCMV MCP vergleichbar zu kristallisieren ist (38). Nachfolgende Röntgenstrukturanalysen in An- bzw. Abwesenheit von AIC2 und AIC3 könnten so zu der Aufklärung des inhibitorischen Wirkmechanismus dieser Substanzen beitragen.

Zusammenfassend wird, basierend auf den durchgeführten Analysen zum Wirkmechanismus von AIC2 und AIC3, angenommen, dass diese ihre antivirale Wirkung über eine *Wechselwirkung* mit dem HCMV-Hauptkapsidprotein vermitteln, da alle AIC2- bzw. AIC3-resistenten Viren ausschließlich *innerhalb* des HCMV MCP Resistenzmutationen enthalten. AIC2 und AIC3 besitzen einen fast identischen Wirkmechanismus, weichen in ihrer spezifischen molekularen Interaktion mit dem Hauptkapsidprotein jedoch voneinander ab. So konnten - neben einer AIC2-Resistenz - AIC2/AIC3-Kreuzresistenzen sowie eine in Abhängigkeit von Substanz

voneinander abweichende Virusreplikation dokumentiert werden. Ferner wird angenommen, dass die Interaktion von AIC2 bzw. AIC3 die Hexon- bzw. Penton-Konformation innerhalb des Prokapsids modifiziert. Daraus resultierend können die Triplexe nicht mehr ordnungsgemäß mit den aberranten Hexon- bzw. Penton-Strukturen interagieren, was möglicherweise zum Verlust der Prokapsid-Struktur und damit zu den in der TEM-Analyse dokumentierten, deformierten Nukleokapsidstrukturen führt. Aufbauend darauf ist denkbar, dass in Anwesenheit von Substanz die jeweilige Resistenzmutation eine Stabilisierung der Hexon- und Penton-Strukturen vermittelt, was zu einer ordnungsgemäßen Bindung der Triplexe führt und damit eine nachfolgende Kapsidreifung ermöglicht. Inwieweit bei diesem Prozess die Interaktion von AIC2 bzw. AIC3 mit dem Hauptkapsidprotein unterbunden wird, bleibt noch zu klären. Ob es sich darüber hinaus bei AIC2 bzw. AIC3 um strukturelle Inhibitoren handelt, die über eine Wechselwirkung mit den oben genannten Strukturproteinen ihre antivirale Wirkung entfalten oder um funktionelle Inhibitoren handelt, die einen enzymatischen Prozess im Zuge der Kapsidreifung inhibieren, muss in weiterführenden Experimenten untersucht werden.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde gezeigt, dass die drei neuartigen antiviralen Substanzen AIC246 (Leternovir), AIC2 und AIC3 einen anderen Wirkmechanismus als die bereits als Anti-HCMV-Medikament zugelassenen Polymeraseinhibitoren aufweisen. AIC246 interferiert - ähnlich aber nicht identisch - wie die beschriebenen Terminaseinhibitoren Bay 38-4766 und BDCRB mit der Prozessierung und Verpackung der viralen genomischen DNA. AIC2 und AIC3 dagegen weisen einen für Herpesviren gänzlich neuartigen und erstmalig in dieser Arbeit beschriebenen Wirkmechanismus auf, indem sie mit der strukturellen Integrität des viralen Nukleokapsids interferieren. Die nicht vorhandene Kreuzresistenz von AIC246, AIC2 bzw. AIC3 zu den zugelassenen Anti-HCMV-Medikamenten, verbunden mit ihren hervorragenden präklinischen und klinischen Daten, deuten auf eine weitere, vielversprechende klinische Entwicklung dieser überaus potenten niedermolekularen HCMV-Inhibitoren hin.

Zusammenfassung

Das humane Cytomegalovirus (HCMV) ist ein wichtiges Pathogen mit klinischer Relevanz bei Patienten mit supprimiertem oder geschwächtem Immunsystem sowie bei Neugeborenen. Alle bisher gegen HCMV zugelassenen Medikamente inhibieren die virale DNA-Polymerase und sind mit schwerwiegenden Toxizitäts- und Resistenzproblematiken verbunden. Deshalb ist die Entwicklung potenter antiviraler Substanzen mit neuartigen Wirkmechanismen dringend erforderlich.

Hochdurchsatzscreenings und nachfolgende Leitstrukturoptimierungen führten zu den drei neuartigen Entwicklungskandidaten AIC246 (Letermovir), AIC2 und AIC3, deren molekulare Wirkmechanismen in der vorliegenden Arbeit charakterisiert wurden.

AIC246, AIC2 und AIC3 vermitteln ihren inhibitorischen Effekt in der späten Phase des HCMV-Replikationszyklus, beeinträchtigen nicht die virale DNA-Synthese und unterscheiden sich damit von den derzeit als Anti-HCMV-Medikament zugelassenen Polymeraseinhibitoren. Während AIC246 nicht mit der viralen Genexpression interferiert, führen AIC2 und AIC3 zu einer Aggregation und Akkumulation von viralen Strukturproteinen. TEM-Analysen zeigten, dass alle AIC-Substanzen einen Prozess im Zellkern inhibieren und daraus resultierend der nukleäre *egress* reifer Viruspartikel unterbunden wird. Während AIC246 eine signifikante Reduktion von C-Kapsid-artigen Partikeln induziert, führt die Verabreichung von AIC2 bzw. AIC3 zu einer Aggregation von Kapsid-Vorläuferstrukturen. Genotypisierungen substanzresistenter Virusstämme verbunden mit Markertransfer-Analysen zeigten, dass AIC246 mit der großen viralen Terminaseuntereinheit pUL56 interferiert und damit die ordnungsgemäße Prozessierung und Verpackung der viralen genomischen DNA in das Nukleokapsid inhibiert. Dagegen interferieren AIC2 und AIC3 mit dem Hauptkapsidprotein MCP und damit mit der strukturellen und funktionellen Integrität des viralen Nukleokapsids. Damit besitzt AIC246 einen mit beschriebenen Terminaseinhibitoren vergleichbaren, aber nicht identischen molekularen Wirkmechanismus, während AIC2 und AIC3 einen für Herpesviren völlig neuen und in dieser Arbeit erstmalig beschriebenen antiviralen Wirkmechanismus aufweisen, der sich von allen anderen Anti-HCMV-Substanzen abgrenzt.

Summary

In spite of substantial therapeutic and diagnostic progress in the management of HCMV-infection, human cytomegalovirus remains an important opportunistic pathogen with high clinical relevance. Due to high toxicity and the emergence of resistant virus, the use of currently licensed drugs for the treatment of severe HCMV infections is limited. Hence, the development of novel potent antiviral substances with fewer side effects is urgently needed.

High-throughput-screening followed by hit to lead optimisation led to the identification of the small molecule HCMV-inhibitors AIC246 (Letermovir), AIC2 und AIC3. The aim of this study was the characterization of the modes of action of these novel antiviral compounds.

Our findings indicate that AIC246, AIC2 und AIC3 act during the late phase of HCMV replication, do not interfere with viral DNA synthesis and thus provide a mechanism of action that is distinct from that of existing anti-HCMV drugs (polymerase inhibitors). AIC246 does not alter viral gene expression whereas AIC2 and AIC3 induce an aggregation and accumulation of viral structural proteins. TEM-analyses further revealed that the frequency of C-capsid-like particles is significantly reduced upon AIC246 treatment. In contrast, AIC2 and AIC3 induce the assembly of malformed nucleocapsid structures. Both the AIC246- as well as the AIC2-/AIC3-mediated inhibition is accompanied by the prevention of nuclear egress of capsids.

Genotyping of resistant viruses and marker transfer experiments revealed that AIC246 interferes with the processing and packaging of viral DNA by targeting the terminase complex via a molecular mechanism that is distinct to that of other terminase inhibitors. On the other hand, AIC2 and AIC3 interfere with the structural integrity of the viral nucleocapsid by targeting the major capsid protein. This mechanism provides a unique mode of action among currently available anti-herpesvirus drugs.

Referenzen

1. **Adler, H., M. Messerle, and U. H. Koszinowski.** 2003. Cloning of herpesviral genomes as bacterial artificial chromosomes. *Rev Med Virol* **13**:111-21.
2. **Ahn, J. H., W. J. Jang, and G. S. Hayward.** 1999. The human cytomegalovirus IE2 and UL112-113 proteins accumulate in viral DNA replication compartments that initiate from the periphery of promyelocytic leukemia protein-associated nuclear bodies (PODs or ND10). *J Virol* **73**:10458-71.
3. **AiCuris.** 2012. Press Release. AiCuris Drug Letemovir (AIC246) meets primary efficacy endpoints in phase 2 for human cytomegalovirus (HCMV) prophylaxis in human blood precursor cell recipients. 14.02.2012.
4. **Alain, S., M. C. Mazon, J. M. Pepin, F. Morinet, L. Raskine, and M. J. Sanson-Le Pors.** 1993. Rapid detection of cytomegalovirus strains resistant to ganciclovir through mutations within the gene UL97. *Mol Cell Probes* **7**:487-95.
5. **Anders, D. G., M. A. Kacica, G. Pari, and S. M. Punturieri.** 1992. Boundaries and structure of human cytomegalovirus oriLyt, a complex origin for lytic-phase DNA replication. *J Virol* **66**:3373-84.
6. **Andrei, G., C. E. De, and R. Snoeck.** 2009. Drug targets in cytomegalovirus infection. *Infect.Disord.Drug Targets.* **9**:201-222.
7. **Andreoni, M., M. Faircloth, L. Vugler, and W. J. Britt.** 1989. A rapid microneutralization assay for the measurement of neutralizing antibody reactive with human cytomegalovirus. *J.Virol.Methods* **23**:157-167.
8. **Appleton, B. A., A. Loregian, D. J. Filman, D. M. Coen, and J. M. Hogle.** 2004. The cytomegalovirus DNA polymerase subunit UL44 forms a C clamp-shaped dimer. *Mol Cell* **15**:233-44.
9. **Baker, M. L., W. Jiang, B. R. Bowman, Z. H. Zhou, F. A. Quioco, F. J. Rixon, and W. Chiu.** 2003. Architecture of the herpes simplex virus major capsid protein derived from structural bioinformatics. *J.Mol.Biol.* **331**:447-456.
10. **Baldanti, F., D. Lilleri, G. Campanini, G. Comolli, A. L. Ridolfo, S. Rusconi, and G. Gerna.** 2004. Human cytomegalovirus double resistance in a donor-positive/recipient-negative lung transplant patient with an impaired CD4-mediated specific immune response. *J Antimicrob Chemother* **53**:536-9.
11. **Baldanti, F., A. Sarasini, E. Silini, M. Barbi, A. Lazzarin, K. K. Biron, and G. Gerna.** 1995. Four dually resistant human cytomegalovirus strains from AIDS patients: single mutations in UL97 and UL54 open reading frames are responsible for ganciclovir- and foscarnet-specific resistance, respectively. *Scand J Infect Dis Suppl* **99**:103-4.

12. **Baldanti, F., M. R. Underwood, S. C. Stanat, K. K. Biron, S. Chou, A. Sarasini, E. Silini, and G. Gerna.** 1996. Single amino acid changes in the DNA polymerase confer foscarnet resistance and slow-growth phenotype, while mutations in the UL97-encoded phosphotransferase confer ganciclovir resistance in three double-resistant human cytomegalovirus strains recovered from patients with AIDS. *J Virol* **70**:1390-5.
13. **Baxter M K, G. W.** 1997. The putative human cytomegalovirus triplex proteins, minor capsid protein (mCP) and mCP-binding protein (mC-BP), form a heterotrimeric complex that localizes to the cell nucleus in the absence of other viral proteins., 22nd International Herpesvirus Workshop, La Jolla, California, USA.
14. **Beaudet-Miller, M., R. Zhang, J. Durkin, W. Gibson, A. D. Kwong, and Z. Hong.** 1996. Virus-specific interaction between the human cytomegalovirus major capsid protein and the C terminus of the assembly protein precursor. *J.Virol.* **70**:8081-8088.
15. **Berndt, A., H. Hofmann-Winkler, N. Tavalai, G. Hahn, and T. Stamminger.** 2009. Importance of covalent and non-covalent SUMO interactions of the major human cytomegalovirus transactivator IE2p86 for viral infection. *J.Virol.*
16. **Bhella, D., F. J. Rixon, and D. J. Dargan.** 2000. Cryomicroscopy of human cytomegalovirus virions reveals more densely packed genomic DNA than in herpes simplex virus type 1. *J Mol Biol* **295**:155-61.
17. **Bidanset, D. J., J. R. Beadle, W. B. Wan, K. Y. Hostetler, and E. R. Kern.** 2004. Oral activity of ether lipid ester prodrugs of cidofovir against experimental human cytomegalovirus infection. *J.Infect.Dis.* **190**:499-503.
18. **Bidanset, D. J., J. R. Beadle, W. B. Wan, K. Y. Hostetler, and E. R. Kern.** 2004. Oral activity of ether lipid ester prodrugs of cidofovir against experimental human cytomegalovirus infection. *J Infect Dis* **190**:499-503.
19. **Bila, V., B. Otova, R. Jelinek, M. Sladka, B. Mejnarova, A. Holy, and V. Kren.** 1993. Antimitotic and teratogenic effects of acyclic nucleotide analogues 1-(S)-(3-hydroxy-2-phosphonomethoxyethyl)cytosine (HPMPC) and 9-(2-phosphonomethoxyethyl) adenine (PMEA). *Folia Biol (Praha)* **39**:150-61.
20. **Biron, K. K.** 2006. Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases. *Antiviral Res.* **71**:154-163.
21. **Biron, K. K., R. J. Harvey, S. C. Chamberlain, S. S. Good, A. A. Smith, III, M. G. Davis, C. L. Talarico, W. H. Miller, R. Ferris, R. E. Dornsife, S. C. Stanat, J. C. Drach, L. B. Townsend, and G. W. Koszalka.** 2002. Potent and selective inhibition of human cytomegalovirus replication by 1263W94, a benzimidazole L-riboside with a unique mode of action. *Antimicrob.Agents Chemother.* **46**:2365-2372.
22. **Biron, K. K., S. C. Stanat, J. B. Sorrell, J. A. Fyfe, P. M. Keller, C. U. Lambe, and D. J. Nelson.** 1985. Metabolic activation of the nucleoside analog 9-[(2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy)methyl]guanine in human diploid fibroblasts infected with human cytomegalovirus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **82**:2473-2477.
23. **Biswas, S., M. Swift, and H. J. Field.** 2007. High frequency of spontaneous helicase-primase inhibitor (BAY 57-1293) drug-resistant variants in certain laboratory isolates of HSV-1. *Antivir.Chem.Chemother.* **18**:13-23.

24. **Blackman, S. C., N. S. Lurain, D. P. Witte, A. H. Filipovich, P. Groen, and M. R. Schleiss.** 2004. Emergence and compartmentalization of fatal multi-drug-resistant cytomegalovirus infection in a patient with autosomal-recessive severe combined immune deficiency. *J Pediatr Hematol Oncol* **26**:601-5.
25. **Bodaghi, B., T. R. Jones, D. Zipeto, C. Vita, L. Sun, L. Laurent, F. Arenzana-Seisdedos, J. L. Virelizier, and S. Michelson.** 1998. Chemokine sequestration by viral chemoreceptors as a novel viral escape strategy: withdrawal of chemokines from the environment of cytomegalovirus-infected cells. *J Exp Med* **188**:855-66.
26. **Bodaghi, B., M. E. Slobbe-van Drunen, A. Topilko, E. Perret, R. C. Vossen, M. C. van Dam-Mieras, D. Zipeto, J. L. Virelizier, P. LeHoang, C. A. Bruggeman, and S. Michelson.** 1999. Entry of human cytomegalovirus into retinal pigment epithelial and endothelial cells by endocytosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**:2598-607.
27. **Boeckh, P. D. G. u. M.** 2007. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis.* Cambridge University Press, Cambridge.
28. **Bogner, E., B. Anheier, F. Offner, C. Smuda, M. Reschke, M. Eickmann, and K. Radsak.** 1997. Nuclear translocation of mutagenized forms of human cytomegalovirus glycoprotein B (gpUL55). *J Gen Virol* **78 (Pt 7)**:1647-51.
29. **Bogner, E., K. Radsak, and M. F. Stinski.** 1998. The gene product of human cytomegalovirus open reading frame UL56 binds the pac motif and has specific nuclease activity. *J. Virol.* **72**:2259-2264.
30. **Bold, S., M. Ohlin, W. Garten, and K. Radsak.** 1996. Structural domains involved in human cytomegalovirus glycoprotein B-mediated cell-cell fusion. *J Gen Virol* **77 (Pt 9)**:2297-302.
31. **Bolovan-Fritts, C. A., E. S. Mocarski, and J. A. Wiedeman.** 1999. Peripheral blood CD14(+) cells from healthy subjects carry a circular conformation of latent cytomegalovirus genome. *Blood* **93**:394-8.
32. **Boppana, S. B., K. B. Fowler, R. F. Pass, L. B. Rivera, R. D. Bradford, F. D. Lakeman, and W. J. Britt.** 2005. Congenital cytomegalovirus infection: association between virus burden in infancy and hearing loss. *J. Pediatr.* **146**:817-823.
33. **Boppana, S. B., L. B. Rivera, K. B. Fowler, M. Mach, and W. J. Britt.** 2001. Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. *N Engl J Med* **344**:1366-71.
34. **Borst, E., and M. Messerle.** 2000. Development of a cytomegalovirus vector for somatic gene therapy. *Bone Marrow Transplant.* **25 Suppl 2**:S80-S82.
35. **Borst, E. M., G. Hahn, U. H. Koszinowski, and M. Messerle.** 1999. Cloning of the human cytomegalovirus (HCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*: a new approach for construction of HCMV mutants. *J. Virol.* **73**:8320-8329.
36. **Borst, E. M., and M. Messerle.** 2005. Analysis of human cytomegalovirus oriLyt sequence requirements in the context of the viral genome. *J. Virol.* **79**:3615-3626.
37. **Bowden, R. A., and J. D. Meyers.** 1990. Prophylaxis of cytomegalovirus infection. *Semin Hematol* **27**:17-21; discussion 28-9.

38. **Bowman, B. R., M. L. Baker, F. J. Rixon, W. Chiu, and F. A. Quioco.** 2003. Structure of the herpesvirus major capsid protein. *EMBO J.* **22**:757-765.
39. **Boyle, K. A., and T. Compton.** 1998. Receptor-binding properties of a soluble form of human cytomegalovirus glycoprotein B. *J Virol* **72**:1826-33.
40. **Bravo, F. J., D. I. Bernstein, J. R. Beadle, K. Y. Hostetler, and R. D. Cardin.** 2011. Oral hexadecyloxypropyl-cidofovir therapy in pregnant guinea pigs improves outcome in the congenital model of cytomegalovirus infection. *Antimicrob Agents Chemother* **55**:35-41.
41. **Brignole, E. J., and W. Gibson.** 2007. Enzymatic activities of human cytomegalovirus maturational protease assemblin and its precursor (pPR, pUL80a) are comparable: [corrected] maximal activity of pPR requires self-interaction through its scaffolding domain. *J.Virol.* **81**:4091-4103.
42. **Britt, W.** 2007. Virus entry into host, establishment of infection, spread in host, mechanisms of tissue damage. *In Human Herpesviruses. Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis.* Page 734-764. Cambridge University Press, Cambridge.
43. **Britt, W. J.** 2007. Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis. Cambridge University Press, Cambridge.
44. **Buchkovich, N. J., T. G. Maguire, and J. C. Alwine.** 2010. Role of the endoplasmic reticulum chaperone BiP, SUN domain proteins, and dynein in altering nuclear morphology during human cytomegalovirus infection. *J Virol* **84**:7005-17.
45. **Buerger, I., J. Reefschlaeger, W. Bender, P. Eckenberg, A. Popp, O. Weber, S. Graeper, H. D. Klenk, H. Ruebsamen-Waigmann, and S. Hallenberger.** 2001. A novel nonnucleoside inhibitor specifically targets cytomegalovirus DNA maturation via the UL89 and UL56 gene products. *J.Virol.* **75**:9077-9086.
46. **Butcher, S. J., J. Aitken, J. Mitchell, B. Gowen, and D. J. Dargan.** 1998. Structure of the human cytomegalovirus B capsid by electron cryomicroscopy and image reconstruction. *J Struct.Biol.* **124**:70-76.
47. **Camozzi, D., S. Pignatelli, C. Valvo, G. Lattanzi, C. Capanni, P. Dal Monte, and M. P. Landini.** 2008. Remodelling of the nuclear lamina during human cytomegalovirus infection: role of the viral proteins pUL50 and pUL53. *J Gen Virol* **89**:731-40.
48. **Casaday, R. J., J. R. Bailey, S. R. Kalb, E. J. Brignole, A. N. Loveland, R. J. Cotter, and W. Gibson.** 2004. Assembly protein precursor (pUL80.5 homolog) of simian cytomegalovirus is phosphorylated at a glycogen synthase kinase 3 site and its downstream "priming" site: phosphorylation affects interactions of protein with itself and with major capsid protein. *J.Virol.* **78**:13501-13511.
49. **Cepeda, V., M. Esteban, and A. Fraile-Ramos.** 2011. Human cytomegalovirus final envelopment on membranes containing both trans-Golgi network and endosomal markers. *Cell Microbiol* **12**:386-404.
50. **Cha, T. A., E. Tom, G. W. Kemble, G. M. Duke, E. S. Mocarski, and R. R. Spaete.** 1996. Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *J Virol* **70**:78-83.

51. **Champier, G., A. Couvreur, S. Hantz, A. Rametti, M. C. Mazon, S. Bouaziz, F. Denis, and S. Alain.** 2008. Putative functional domains of human cytomegalovirus pUL56 involved in dimerization and benzimidazole D-ribonucleoside activity. *Antivir. Ther* **13**:643-654.
52. **Champier, G., S. Hantz, A. Couvreur, S. Stuppfler, M. C. Mazon, S. Bouaziz, F. Denis, and S. Alain.** 2007. New functional domains of human cytomegalovirus pUL89 predicted by sequence analysis and three-dimensional modelling of the catalytic site DEXDc. *Antivir. Ther.* **12**:217-232.
53. **Chandler, S. H., K. K. Holmes, B. B. Wentworth, L. T. Gutman, P. J. Wiesner, E. R. Alexander, and H. H. Handsfield.** 1985. The epidemiology of cytomegaloviral infection in women attending a sexually transmitted disease clinic. *J Infect Dis* **152**:597-605.
54. **Chang, Y., E. Cesarman, M. S. Pessin, F. Lee, J. Culpepper, D. M. Knowles, and P. S. Moore.** 1994. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* **266**:1865-9.
55. **Chee, M. S., A. T. Bankier, S. Beck, R. Bohni, C. M. Brown, R. Cerny, T. Horsnell, C. A. Hutchison, 3rd, T. Kouzarides, J. A. Martignetti, and et al.** 1990. Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol* **154**:125-69.
56. **Chen, D. H., H. Jiang, M. Lee, F. Liu, and Z. H. Zhou.** 1999. Three-dimensional visualization of tegument/capsid interactions in the intact human cytomegalovirus. *Virology* **260**:10-16.
57. **Chi, J. H., and D. W. Wilson.** 2000. ATP-Dependent localization of the herpes simplex virus capsid protein VP26 to sites of procapsid maturation. *J Virol* **74**:1468-76.
58. **Chimerix.** 2012. Chimerix Antiviral Compound CMX001 Meets CMV Phase 2 Primary Endpoint in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. http://www.chimerix.com/site/resources/12-02-06_Chimerix_Antiviral_Compound_CMX001_Meets_CMV_Ph_2_Primary_Endpoint_in_Allogeneic_Hematopoietic_Stem_Cell_Transplant_Recipients.pdf.
59. **Chimerix.** 2011. CMX001 in Post-transplant Patients With BK Virus Viruria. <http://clinicaltrials.gov> ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00793598.
60. **Chimerix.** 2010. Comparative Bioavailability and Effect of Food on CMX001 in Healthy Volunteers. <http://clinicaltrials.gov> ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00780182.
61. **Chimerix.** 2011. Dose-escalation Study of the Safety, Tolerability and Ability of CMX001 to Prevent or Control Cytomegalovirus (CMV) Infection in R+ Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. <http://clinicaltrials.gov> ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00942305.
62. **Chimerix.** 2009. Dose-escalation Study of the Safety, Tolerability and Ability of CMX001 to Prevent or Control Cytomegalovirus (CMV) Infection in R+ Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. <http://clinicaltrials.gov> ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00942305.
63. **Chimerix.** 2011. A Multicenter, Open-label Study of CMX001 Treatment of Serious Diseases or Conditions Caused by dsDNA Viruses. <http://clinicaltrials.gov> ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01143181.

64. **Chothia, C., and A. M. Lesk.** 1986. The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *Embo J* **5**:823-6.
65. **Chou, S., G. Marousek, S. Auerochs, T. Stamminger, J. Milbradt, and M. Marschall.** 2011. The unique antiviral activity of artesunate is broadly effective against human cytomegaloviruses including therapy-resistant mutants. *Antiviral Res.*
66. **Chou, S., G. Marousek, S. Li, and A. Weinberg.** 2008. Contrasting drug resistance phenotypes resulting from cytomegalovirus DNA polymerase mutations at the same exonuclease locus. *J.Clin Virol.*
67. **Chou, S., L. C. Wechel, and G. I. Marousek.** 2007. Cytomegalovirus UL97 kinase mutations that confer maribavir resistance. *J.Infect.Dis.* **196**:91-94.
68. **Chrisp, P., and S. P. Clissold.** 1991. Foscarnet. A review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use in immunocompromised patients with cytomegalovirus retinitis. *Drugs* **41**:104-29.
69. **Coen, D. M., P. A. Furman, P. T. Gelep, and P. A. Schaffer.** 1982. Mutations in the herpes simplex virus DNA polymerase gene can confer resistance to 9-beta-D-arabinofuranosyladenine. *J.Virol.* **41**:909-918.
70. **Cohen, J. I., and G. R. Corey.** 1985. Cytomegalovirus infection in the normal host. *Medicine (Baltimore)* **64**:100-14.
71. **Compton, T.** 1993. An Immortalized Human Fibroblast Cell Line Is Permissive for Human Cytomegalovirus Infection.
72. **Compton, T., R. R. Nepomuceno, and D. M. Nowlin.** 1992. Human cytomegalovirus penetrates host cells by pH-independent fusion at the cell surface. *Virology* **191**:387-95.
73. **Couvreux, A., S. Hantz, R. Marquant, G. Champier, S. Alain, N. Morellet, and S. Bouaziz.** 2010. Insight into the structure of the pUL89 C-terminal domain of the human cytomegalovirus terminase complex. *Proteins* **78**:1520-1530.
74. **Daga, P. R., R. Y. Patel, and R. J. Doerksen.** 2010. Template-based protein modeling: recent methodological advances. *Curr Top Med Chem* **10**:84-94.
75. **Das, S., and P. E. Pellett.** 2011. Spatial Relationships between Markers for Secretory and Endosomal Machinery in Human Cytomegalovirus-Infected Cells versus Those in Uninfected Cells. *J Virol* **85**:5864-79.
76. **Das, S., A. Vasanji, and P. E. Pellett.** 2007. Three-dimensional structure of the human cytomegalovirus cytoplasmic virion assembly complex includes a reoriented secretory apparatus. *J Virol* **81**:11861-9.
77. **Davison, A. J.** 2010. Herpesvirus systematics. *Vet Microbiol.*:52–69.
78. **Davison, A. J.** 2007. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis.* Cambridge University Press, Cambridge.

79. **Davison, A. J., A. Dolan, P. Akter, C. Addison, D. J. Dargan, D. J. Alcendor, D. J. McGeoch, and G. S. Hayward.** 2003. The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *J Gen Virol* **84**:17-28.
80. **De Clercq, E., and A. Holy.** 2005. Acyclic nucleoside phosphonates: a key class of antiviral drugs. *Nat Rev Drug Discov* **4**:928-40.
81. **Deayton, J., A. Mocroft, P. Wilson, V. C. Emery, M. A. Johnson, and P. D. Griffiths.** 1999. Loss of cytomegalovirus (CMV) viraemia following highly active antiretroviral therapy in the absence of specific anti-CMV therapy. *Aids* **13**:1203-6.
82. **Deayton, J. R., C. A. Prof Sabin, M. A. Johnson, V. C. Emery, P. Wilson, and P. D. Griffiths.** 2004. Importance of cytomegalovirus viraemia in risk of disease progression and death in HIV-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Lancet* **363**:2116-21.
83. **Desai, P., and S. Person.** 1999. Second site mutations in the N-terminus of the major capsid protein (VP5) overcome a block at the maturation cleavage site of the capsid scaffold proteins of herpes simplex virus type 1. *Virology* **261**:357-366.
84. **Dittmer, A., and E. Bogner.** 2005. Analysis of the quaternary structure of the putative HCMV portal protein PUL104. *Biochemistry* **44**:759-65.
85. **Dittmer, A., J. C. Drach, L. B. Townsend, A. Fischer, and E. Bogner.** 2005. Interaction of the putative human cytomegalovirus portal protein pUL104 with the large terminase subunit pUL56 and its inhibition by benzimidazole-D-ribonucleosides. *J.Virol.* **79**:14660-14667.
86. **Dollard, S. C., S. D. Grosse, and D. S. Ross.** 2007. New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection. *Rev.Med.Virol.* **17**:355-363.
87. **Drew, W. L.** 2003. Cytomegalovirus Disease in the Highly Active Antiretroviral Therapy Era. *Curr Infect Dis Rep* **5**:257-265.
88. **Drew, W. L.** 1992. Cytomegalovirus infection in patients with AIDS. *Clin Infect Dis* **14**:608-15.
89. **Drew, W. L., R. C. Miner, G. I. Marousek, and S. Chou.** 2006. Maribavir sensitivity of cytomegalovirus isolates resistant to ganciclovir, cidofovir or foscarnet. *J Clin Virol* **37**:124-7.
90. **Dropulic, L. K., and J. I. Cohen.** 2010. Update on new antivirals under development for the treatment of double-stranded DNA virus infections. *Clin Pharmacol Ther* **88**:610-9.
91. **E.M. Borst, J. K.-A., I. Gabaev, R. Bauerfeind, A. Binz, M. Babic-Cac, S. Jonjic, M. Messerle.** 2012. Presented at the 22nd Annual Meeting of the Society for Virology., Essen, Germany.
92. **Efferth, T., M. R. Romero, D. G. Wolf, T. Stamminger, J. J. Marin, and M. Marschall.** 2008. The antiviral activities of artemisinin and artesunate. *Clin Infect Dis* **47**:804-11.
93. **Efferth, T., M. R. Romero, D. G. Wolf, T. Stamminger, J. J. Marin, and M. Marschall.** 2008. The antiviral activities of artemisinin and artesunate. *Clin.Infect.Dis.* **47**:804-811.

94. **Eickmann, M., D. Gicklhorn, and K. Radsak.** p. 245–264. 2006. Glycoprotein trafficking in virion morphogenesis. *In* M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology*. Caister Academic Press, Norfolk,VA.
95. **Elek, S. D., and H. Stern.** 1974. Development of a vaccine against mental retardation caused by cytomegalovirus infection in utero. *Lancet* **1**:1-5.
96. **Emery, V. C.** 1999. Viral dynamics during active cytomegalovirus infection and pathology. *Intervirology* **42**:405-11.
97. **Emery, V. C., A. V. Cope, E. F. Bowen, D. Gor, and P. D. Griffiths.** 1999. The dynamics of human cytomegalovirus replication in vivo. *J.Exp.Med.* **190**:177-182.
98. **Evers, D. L., G. Komazin, D. Shin, D. D. Hwang, L. B. Townsend, and J. C. Drach.** 2002. Interactions among antiviral drugs acting late in the replication cycle of human cytomegalovirus. *Antiviral Res.* **56**:61-72.
99. **Falagas, M. E., D. R. Snyderman, J. Griffith, and B. G. Werner.** 1996. Exposure to cytomegalovirus from the donated organ is a risk factor for bacteremia in orthotopic liver transplant recipients. Boston Center for Liver Transplantation CMVIG Study Group. *Clin Infect Dis* **23**:468-74.
100. **Feire, A. L., H. Koss, and T. Compton.** 2004. Cellular integrins function as entry receptors for human cytomegalovirus via a highly conserved disintegrin-like domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:15470-5.
101. **Feire, A. L., R. M. Roy, K. Manley, and T. Compton.** 2010. The glycoprotein B disintegrin-like domain binds beta 1 integrin to mediate cytomegalovirus entry. *J Virol* **84**:10026-37.
102. **Fernandes, S. M., E. J. Brignole, and W. Gibson.** 2011. Cytomegalovirus capsid protease: biological substrates are cleaved more efficiently by full-length enzyme (pUL80a) than by the catalytic domain (assemblin). *J Virol* **85**:3526-34.
103. **Fiser, A., and A. Sali.** 2003. Modeller: generation and refinement of homology-based protein structure models. *Methods Enzymol* **374**:461-91.
104. **Fowler, K. B., and R. F. Pass.** 1991. Sexually transmitted diseases in mothers of neonates with congenital cytomegalovirus infection. *J Infect Dis* **164**:259-64.
105. **Fowler, S. B. B. a. K. B.** 2007. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge University Press, Cambridge.
106. **Freeman, R. B., Jr.** 2009. The 'indirect' effects of cytomegalovirus infection. *Am.J.Transplant.* **9**:2453-2458.
107. **Gandhi, M. K., and R. Khanna.** 2004. Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *Lancet Infect.Dis.* **4**:725-738.
108. **Gentry, B. G., S. N. Gentry, T. L. Jackson, J. Zemlicka, and J. C. Drach.** Phosphorylation of antiviral and endogenous nucleotides to di- and triphosphates by guanosine monophosphate kinase. *Biochem.Pharmacol.*

109. **Gentry, B. G., J. P. Kamil, D. M. Coen, J. Zemlicka, and J. C. Drach.** Stereoselective Phosphorylation of Cyclopropavir by pUL97 and Competitive Inhibition by Maribavir. *Antimicrob. Agents Chemother.*
110. **Gibson, W.** 2001. Action at the assembly dimer interface. *Nature Structural Biology* 739 - 741
111. **Gibson, W.** 2005. Assembly and maturation of the capsid, p. 231-243. *In* M. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: Molecular Biology and Immunology*. Horizon Scientific Press, Norwich UK.
112. **Gibson, W.** 1996. Structure and Assembly of the Virion. *Intervirology* **39**:389-400.
113. **Gibson, W., M. K. Baxter, and K. S. Clopper.** 1996. Cytomegalovirus "missing" capsid protein identified as heat-aggregable product of human cytomegalovirus UL46. *J. Virol.* **70**:7454-7461.
114. **Gibson, W., K. S. Clopper, W. J. Britt, and M. K. Baxter.** 1996. Human cytomegalovirus (HCMV) smallest capsid protein identified as product of short open reading frame located between HCMV UL48 and UL49. *J. Virol.* **70**:5680-5683.
115. **Gilbert, C., J. Bestman-Smith, and G. Boivin.** 2002. Resistance of herpesviruses to antiviral drugs: clinical impacts and molecular mechanisms. *Drug Resist Updat* **5**:88-114.
116. **Gold, E. a. N., G. A.** 1976. *Cytomegalovirus*. Plenum Press., New York.
117. **Goldner, T., G. Hewlett, N. Ettischer, H. Ruebsamen-Schaeff, H. Zimmermann, and P. Lischka.** 2011. The Novel Anticytomegalovirus Compound AIC246 (Letermovir) Inhibits Human Cytomegalovirus Replication through a Specific Antiviral Mechanism That Involves the Viral Terminase. *J Virol* **85**:10884-93.
118. **Goodpasture E.W., T. F. B.** 1920. Concerning nature of „protozoan like” cells in certain lesions of infancy. *J Infect Dis* **26**:347-350.
119. **Grattan, M. T., C. E. Moreno-Cabral, V. A. Starnes, P. E. Oyer, E. B. Stinson, and N. E. Shumway.** 1989. Cytomegalovirus infection is associated with cardiac allograft rejection and atherosclerosis. *Jama* **261**:3561-6.
120. **Gretch, D. R., B. Kari, L. Rasmussen, R. C. Gehrz, and M. F. Stinski.** 1988. Identification and characterization of three distinct families of glycoprotein complexes in the envelopes of human cytomegalovirus. *J Virol* **62**:875-81.
121. **Hadassah-Medical-Organization.** 2010. Artesunate in Preemptive Treatment of Human Cytomegalovirus (CMV) in Stem Cell Transplant Recipients. <http://clinicaltrials.gov/ClinicalTrials.gov/Identifier:NCT00284687>
122. **Hahn, G., R. Jores, and E. S. Mocarski.** 1998. Cytomegalovirus remains latent in a common precursor of dendritic and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:3937-42.
123. **Hahn, G., M. G. Revello, M. Patrone, E. Percivalle, G. Campanini, A. Sarasini, M. Wagner, A. Gallina, G. Milanesi, U. Koszinowski, F. Baldanti, and G. Gerna.** 2004. Human cytomegalovirus UL131-128 genes are indispensable for virus growth in endothelial cells and virus transfer to leukocytes. *J. Virol.* **78**:10023-10033.

124. **Hamzeh, F. M., and P. S. Lietman.** 1991. Intranuclear accumulation of subgenomic noninfectious human cytomegalovirus DNA in infected cells in the presence of ganciclovir. *Antimicrob Agents Chemother* **35**:1818-23.
125. **Harada, K., Y. Eizuru, Y. Isashiki, S. Ihara, and Y. Minamishima.** 1997. Genetic analysis of a clinical isolate of human cytomegalovirus exhibiting resistance against both ganciclovir and cidofovir. *Arch Virol* **142**:215-25.
126. **Hayashi, K., T. Hayashi, and A. Tomoda.** 2008. Phenoxazine derivatives inactivate human cytomegalovirus, herpes simplex virus-1, and herpes simplex virus-2 in vitro. *J Pharmacol Sci* **106**:369-75.
127. **Hayashi, K., J. Mori, H. Saito, and T. Hayashi.** 2006. Antiviral targets of a chromene derivative from *Sargassum micracanthum* in the replication of human cytomegalovirus. *Biol Pharm Bull* **29**:1843-7.
128. **Hayes, K., D. M. Danks, H. Gibas, and I. Jack.** 1972. Cytomegalovirus in human milk. *N Engl J Med* **287**:177-8.
129. **Haynes, P., T. R. Lambert, and I. D. Mitchell.** 1996. Comparative in-vivo genotoxicity of antiviral nucleoside analogues; penciclovir, acyclovir, ganciclovir and the xanthine analogue, caffeine, in the mouse bone marrow micronucleus assay. *Mutat Res* **369**:65-74.
130. **Heldwein, E. E., and C. Krummenacher.** 2008. Entry of herpesviruses into mammalian cells. *Cell Mol Life Sci* **65**:1653-68.
131. **Hensel, G. M., H. H. Meyer, I. Buchmann, D. Pommerehne, S. Schmolke, B. Plachter, K. Radsak, and H. F. Kern.** 1996. Intracellular localization and expression of the human cytomegalovirus matrix phosphoprotein pp71 (ppUL82): evidence for its translocation into the nucleus. *J Gen Virol* **77 (Pt 12)**:3087-97.
132. **Henson, D.** 1967. Cytomegalic inclusion disease following multiple blood transfusions. *Jama* **199**:278-80.
133. **Heymann, J. B., N. Cheng, W. W. Newcomb, B. L. Trus, J. C. Brown, and A. C. Steven.** 2003. Dynamics of herpes simplex virus capsid maturation visualized by time-lapse cryo-electron microscopy. *Nat Struct Biol* **10**:334-41.
134. **Holzenburg, A., A. Dittmer, and E. Bogner.** 2009. Assembly of monomeric human cytomegalovirus pUL104 into portal structures. *J.Gen.Virol.* **90**:2381-2385.
135. **Honess, R. W., and B. Roizman.** 1974. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *J Virol* **14**:8-19.
136. **Hwang, J. S., and E. Bogner.** 2002. ATPase activity of the terminase subunit pUL56 of human cytomegalovirus. *J Biol Chem* **277**:6943-8.
137. **Hwang, J. S., O. Kregler, R. Schilf, N. Bannert, J. C. Drach, L. B. Townsend, and E. Bogner.** 2007. Identification of acetylated, tetrahalogenated benzimidazole D-ribonucleosides with enhanced activity against human cytomegalovirus. *J Virol.* **81**:11604-11611.

138. **Hwang, J. S., R. Schilf, J. C. Drach, L. B. Townsend, and E. Bogner.** 2009. Susceptibilities of human cytomegalovirus clinical isolates and other herpesviruses to new acetylated, tetrahalogenated benzimidazole D-ribonucleosides. *Antimicrob.Agents Chemother.* **53**:5095-5101.
139. **Ihara, S., M. Takekoshi, N. Mori, S. Sakuma, J. Hashimoto, and Y. Watanabe.** 1994. Identification of mutation sites of a temperature-sensitive mutant of HCMV DNA polymerase activity. *Arch Virol* **137**:263-75.
140. **Ioannou, P. A., C. T. Amemiya, J. Garnes, P. M. Kroisel, H. Shizuya, C. Chen, M. A. Batzer, and P. J. de Jong.** 1994. A new bacteriophage P1-derived vector for the propagation of large human DNA fragments. *Nat Genet* **6**:84-9.
141. **Irmiere, A., and W. Gibson.** 1983. Isolation and characterization of a noninfectious virion-like particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus. *Virology* **130**:118-133.
142. **Isaacson, M. K., and T. Compton.** 2009. Human cytomegalovirus glycoprotein B is required for virus entry and cell-to-cell spread but not for virion attachment, assembly, or egress. *J.Virol.* **83**:3891-3903.
143. **Isaacson, M. K., A. L. Feire, and T. Compton.** 2007. Epidermal growth factor receptor is not required for human cytomegalovirus entry or signaling. *J Virol* **81**:6241-7.
144. **Jacobson, M. A., D. Causey, B. Polsky, D. Hardy, M. Chown, R. Davis, J. J. O'Donnell, B. D. Kuppermann, M. H. Heinemann, G. N. Holland, and et al.** 1993. A dose-ranging study of daily maintenance intravenous foscarnet therapy for cytomegalovirus retinitis in AIDS. *J Infect Dis* **168**:444-8.
145. **Jacobson, M. A., W. L. Drew, J. Feinberg, J. J. O'Donnell, P. V. Whitmore, R. D. Miner, and D. Parenti.** 1991. Foscarnet therapy for ganciclovir-resistant cytomegalovirus retinitis in patients with AIDS. *J Infect Dis* **163**:1348-51.
146. **James, S. H., C. B. Hartline, E. A. Harden, E. M. Driebe, J. M. Schupp, D. M. Engelthaler, P. S. Keim, T. L. Bowlin, E. R. Kern, and M. N. Prichard.** 2011. Cyclopropavir inhibits the normal function of the human cytomegalovirus UL97 kinase. *Antimicrob Agents Chemother* **55**:4682-91.
147. **Jarvis, M. A., and J. A. Nelson.** 2007. Molecular basis of persistence and latency. *In Human Herpesviruses. Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis.* Page 765-779. Cambridge University Press, Cambridge.
148. **Jiang, W., M. L. Baker, S. J. Ludtke, and W. Chiu.** 2001. Bridging the information gap: computational tools for intermediate resolution structure interpretation. *Journal of Molecular Biology* **308**:1033-1044.
149. **Kalejta, R. F.** 2008. Tegument proteins of human cytomegalovirus. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **72**:249-65, table.
150. **Kaptein, S. J., T. Efferth, M. Leis, S. Rechter, S. Auerochs, M. Kalmer, C. A. Bruggeman, C. Vink, T. Stamminger, and M. Marschall.** 2006. The anti-malaria drug artesunate inhibits replication of cytomegalovirus in vitro and in vivo. *Antiviral Res.* **69**:60-69.

151. **Katoh, K., G. Asimenos, and H. Toh.** 2009. Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT. *Methods Mol Biol* **537**:39-64.
152. **Katoh, K., K. Misawa, K. Kuma, and T. Miyata.** 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res* **30**:3059-66.
153. **Kaul, D. R., S. Stoelben, E. Cober, T. Ojo, E. Sandusky, P. Lischka, H. Zimmermann, and H. Rubsamen-Schaeff.** 2011. First report of successful treatment of multidrug-resistant cytomegalovirus disease with the novel anti-CMV compound AIC246. *Am J Transplant* **11**:1079-84.
154. **Kern, E. R., D. J. Bidanset, C. B. Hartline, Z. Yan, J. Zemlicka, and D. C. Quenelle.** 2004. Oral activity of a methylenecyclopropane analog, cyclopropavir, in animal models for cytomegalovirus infections. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:4745-53.
155. **Kern, E. R., D. J. Collins, W. B. Wan, J. R. Beadle, K. Y. Hostetler, and D. C. Quenelle.** 2004. Oral treatment of murine cytomegalovirus infections with ether lipid esters of cidofovir. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:3516-22.
156. **Kern, E. R., N. L. Kushner, C. B. Hartline, S. L. Williams-Aziz, E. A. Harden, S. Zhou, J. Zemlicka, and M. N. Prichard.** 2005. In vitro activity and mechanism of action of methylenecyclopropane analogs of nucleosides against herpesvirus replication. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:1039-45.
157. **Kerry, J. A., M. A. Priddy, C. P. Kohler, T. L. Staley, D. Weber, T. R. Jones, and R. M. Stenberg.** 1997. Translational regulation of the human cytomegalovirus pp28 (UL99) late gene. *J Virol* **71**:981-7.
158. **Khoury, J. A., G. A. Storch, D. L. Bohl, R. M. Schuessler, S. M. Torrence, M. Lockwood, M. Gaudreault-Keener, M. J. Koch, B. W. Miller, K. L. Hardinger, M. A. Schnitzler, and D. C. Brennan.** 2006. Prophylactic versus preemptive oral valganciclovir for the management of cytomegalovirus infection in adult renal transplant recipients. *Am.J.Transplant.* **6**:2134-2143.
159. **Kim, H. S., E. Huang, J. Desai, M. Sole, E. N. Pryce, M. E. Okoye, S. Person, and P. J. Desai.** 2011. A domain in the HSV-1 triplex protein VP23 is essential for closure of capsid shells into icosahedral structures. *J Virol.*
160. **Klemola, E., and L. Kaariainen.** 1965. Cytomegalovirus as a possible cause of a disease resembling infectious mononucleosis. *Br Med J* **2**:1099-102.
161. **Klemola, E., and L. Kaariainen.** 1966. [Infectious mononucleosis caused by cytomegalovirus]. *Duodecim* **82**:953-7.
162. **Kmiec, E., and W. K. Holloman.** 1981. Beta protein of bacteriophage lambda promotes renaturation of DNA. *J Biol Chem* **256**:12636-9.
163. **Kohler, C. P., J. A. Kerry, M. Carter, V. P. Muzithras, T. R. Jones, and R. M. Stenberg.** 1994. Use of recombinant virus to assess human cytomegalovirus early and late promoters in the context of the viral genome. *J Virol* **68**:6589-97.
164. **Kondo, K., J. Xu, and E. S. Mocarski.** 1996. Human cytomegalovirus latent gene expression in granulocyte-macrophage progenitors in culture and in seropositive individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:11137-42.

165. **Koszalka, G. W., N. W. Johnson, S. S. Good, L. Boyd, S. C. Chamberlain, L. B. Townsend, J. C. Drach, and K. K. Biron.** 2002. Preclinical and toxicology studies of 1263W94, a potent and selective inhibitor of human cytomegalovirus replication. *Antimicrob.Agents Chemother.* **46**:2373-2380.
166. **Kropeit, D., D. McCormick, O. VonRichter, J. Nagelschmitz, H. Stass, O. Boix, H. Zimmermann, and H. Ruebsamen-Schaeff.** 2010. Presented at the 50th Intersci.Conf.Antimicrob.Agents Chemother (ICAAC). Boston, MA.
167. **Krosky, P. M., M. C. Baek, and D. M. Coen.** 2003. The human cytomegalovirus UL97 protein kinase, an antiviral drug target, is required at the stage of nuclear egress. *J Virol* **77**:905-14.
168. **Krosky, P. M., M. C. Baek, W. J. Jahng, I. Barrera, R. J. Harvey, K. K. Biron, D. M. Coen, and P. B. Sethna.** 2003. The human cytomegalovirus UL44 protein is a substrate for the UL97 protein kinase. *J Virol* **77**:7720-7.
169. **Krosky, P. M., M. R. Underwood, S. R. Turk, K. W. Feng, R. K. Jain, R. G. Ptak, A. C. Westerman, K. K. Biron, L. B. Townsend, and J. C. Drach.** 1998. Resistance of human cytomegalovirus to benzimidazole ribonucleosides maps to two open reading frames: UL89 and UL56. *J.Virol.* **72**:4721-4728.
170. **Kryshtafovych, A., and K. Fidelis.** 2009. Protein structure prediction and model quality assessment. *Drug Discov Today* **14**:386-93.
171. **Kummer, F., N. Konietzko, and T. C. Medici.** 2000. *Pharmakotherapie bronchopulmonaler Erkrankungen.* Springer.
172. **Lai, L., and W. J. Britt.** 2003. The interaction between the major capsid protein and the smallest capsid protein of human cytomegalovirus is dependent on two linear sequences in the smallest capsid protein. *J.Virol.* **77**:2730-2735.
173. **Lalezari, J. P., W. L. Drew, E. Glutzer, C. James, D. Miner, J. Flaherty, P. E. Fisher, K. Cundy, J. Hannigan, J. C. Martin, and et al.** 1995. (S)-1-[3-hydroxy-2-(phosphonylmethoxy)propyl]cytosine (cidofovir): results of a phase I/II study of a novel antiviral nucleotide analogue. *J Infect Dis* **171**:788-96.
174. **Landolfo, S., M. Gariglio, G. Gribaudo, and D. Lembo.** 2003. The human cytomegalovirus. *Pharmacol.Ther.* **98**:269-297.
175. **Lang, D. J., and J. F. Kummer.** 1975. Cytomegalovirus in semen: observations in selected populations. *J Infect Dis* **132**:472-3.
176. **Lanier, R., L. Trost, T. Tippin, B. Lampert, A. Robertson, S. Foster, M. Rose, W. Painter, R. O'Mahony, M. Almond, and G. Painter.** 2010. Development of CMX001 for the Treatment of Poxvirus Infections. *Viruses* **2**:2740-2762.
177. **Larew, M. S., and M. G. Myers.** 1982. Recovery of cytomegalovirus and Chlamydia trachomatis from vaginal tampons. *J Med Virol* **9**:37-42.
178. **Lischka, P., G. Hewlett, T. Wunberg, J. Baumeister, D. Paulsen, T. Goldner, H. Ruebsamen-Schaeff, and H. Zimmermann.** 2010. In vitro and in vivo activities of the novel anticytomegalovirus compound AIC246. *Antimicrob.Agents Chemother.* **54**:1290-7.

179. **Lischka, P., and H. Zimmermann.** 2008. Antiviral strategies to combat cytomegalovirus infections in transplant recipients. *Curr.Opin.Pharmacol.*
180. **Ljungman, P., P. Griffiths, and C. Paya.** 2002. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis* **34**:1094-7.
181. **Ljungman, P., M. Hakki, and M. Boeckh.** 2011. Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Infect.Dis.Clin.North Am.* **24**:319-337.
182. **Loregian, A., B. A. Appleton, J. M. Hogle, and D. M. Coen.** 2004. Residues of human cytomegalovirus DNA polymerase catalytic subunit UL54 that are necessary and sufficient for interaction with the accessory protein UL44. *J Virol* **78**:158-67.
183. **Loregian, A., B. A. Appleton, J. M. Hogle, and D. M. Coen.** 2004. Specific residues in the connector loop of the human cytomegalovirus DNA polymerase accessory protein UL44 are crucial for interaction with the UL54 catalytic subunit. *J Virol* **78**:9084-92.
184. **Lorz, K., H. Hofmann, A. Berndt, N. Tavalai, R. Mueller, U. Schlotzer-Schrehardt, and T. Stamminger.** 2006. Deletion of open reading frame UL26 from the human cytomegalovirus genome results in reduced viral growth, which involves impaired stability of viral particles. *J.Virol.* **80**:5423-5434.
185. **Loveland, A. N., N. L. Nguyen, E. J. Brignole, and W. Gibson.** 2007. The amino-conserved domain of human cytomegalovirus UL80a proteins is required for key interactions during early stages of capsid formation and virus production. *J.Virol.* **81**:620-628.
186. **Lowance, D., H. H. Neumayer, C. M. Legendre, J. P. Squifflet, J. Kovarik, P. J. Brennan, D. Norman, R. Mendez, M. R. Keating, G. L. Coggon, A. Crisp, and I. C. Lee.** 1999. Valacyclovir for the prevention of cytomegalovirus disease after renal transplantation. International Valacyclovir Cytomegalovirus Prophylaxis Transplantation Study Group. *N Engl J Med* **340**:1462-70.
187. **Lu, G., and E. N. Moriyama.** 2004. Vector NTI, a balanced all-in-one sequence analysis suite. *Brief Bioinform* **5**:378-88.
188. **Lurain, N. S., and S. Chou.** 2010. Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus. *Clin.Microbiol.Rev.* **23**:689-712.
189. **Luse, S. A., and M. G. Smith.** 1958. Electron microscopy of salivary gland viruses. *J Exp Med* **107**:623-32.
190. **Ma, J. D., A. N. Nafziger, S. A. Villano, A. Gaedigk, and J. S. Bertino, Jr.** 2006. Maribavir pharmacokinetics and the effects of multiple-dose maribavir on cytochrome P450 (CYP) 1A2, CYP 2C9, CYP 2C19, CYP 2D6, CYP 3A, N-acetyltransferase-2, and xanthine oxidase activities in healthy adults. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:1130-5.
191. **Malaise, J., M. J. Ricart, A. Moreno, M. Crespo, L. Fernandez-Cruz, D. Van Ophem, and J. P. Squifflet.** 2005. Cytomegalovirus infection in simultaneous pancreas-kidney transplantation. *Transplant Proc* **37**:2848-50.
192. **Marschall, M., A. Marzi, S. P. aus dem, R. Jochmann, M. Kalmer, S. Auerochs, P. Lischka, M. Leis, and T. Stamminger.** 2005. Cellular p32 recruits cytomegalovirus kinase pUL97 to redistribute the nuclear lamina. *J.Biol.Chem.* **280**:33357-33367.

193. **Marschall, M., T. Stamminger, A. Urban, S. Wildum, H. Ruebsamen-Schaeff, H. Zimmermann, and P. Lischka.** 2011. In vitro evaluation of the activities of the novel anti-cytomegalovirus compound AIC246 (letermovir) against herpesviruses and other human pathogenic viruses. *Antimicrob Agents Chemother.*
194. **Marty, F. M., P. Ljungman, G. A. Papanicolaou, D. J. Winston, R. F. Chemaly, L. Strasfeld, J. A. Young, T. Rodriguez, J. Maertens, M. Schmitt, H. Einsele, A. Ferrant, J. H. Lipton, S. A. Villano, H. Chen, and M. Boeckh.** 2011. Maribavir prophylaxis for prevention of cytomegalovirus disease in recipients of allogeneic stem-cell transplants: a phase 3, double-blind, placebo-controlled, randomised trial. *Lancet Infect Dis* **11**:284-92.
195. **Matthews, T., and R. Boehme.** 1988. Antiviral activity and mechanism of action of ganciclovir. *Rev Infect Dis* **10 Suppl 3**:S490-4.
196. **McGuffin, L. J., K. Bryson, and D. T. Jones.** 2000. The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* **16**:404-5.
197. **McVoy, M. A., and S. P. Adler.** 1994. Human cytomegalovirus DNA replicates after early circularization by concatemer formation, and inversion occurs within the concatemer. *J Virol.* **68**:1040-1051.
198. **McVoy, M. A., and D. E. Nixon.** 2005. Impact of 2-bromo-5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosyl benzimidazole riboside and inhibitors of DNA, RNA, and protein synthesis on human cytomegalovirus genome maturation. *J Virol.* **79**:11115-11127.
199. **McVoy, M. A., D. E. Nixon, J. K. Hur, and S. P. Adler.** 2000. The ends on herpesvirus DNA replicative concatemers contain pac2 cis cleavage/packaging elements and their formation is controlled by terminal cis sequences. *J Virol.* **74**:1587-1592.
200. **Mercorelli, B., E. Sinigalia, A. Loregian, and G. Palu.** 2008. Human cytomegalovirus DNA replication: antiviral targets and drugs. *Rev Med Virol* **18**:177-210.
201. **Messerle, M., I. Crnkovic, W. Hammerschmidt, H. Ziegler, and U. H. Koszinowski.** 1997. Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:14759-63.
202. **Mettenleiter, T. C., B. G. Klupp, and H. Granzow.** 2006. Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. *Curr Opin Microbiol.* **9**:423-429.
203. **Mettenleiter, T. C., B. G. Klupp, and H. Granzow.** 2009. Herpesvirus assembly: An update. *Virus Res.*
204. **Michaelis, M., H. W. Doerr, and J. Cinatl.** 2009. The story of human cytomegalovirus and cancer: increasing evidence and open questions. *Neoplasia.* **11**:1-9.
205. **Microbiotix, I.** 2011. Safety and Pharmacokinetics of Single Oral Doses of MBX-400 in Healthy Volunteers. <http://clinicaltrials.gov> ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01433835
206. **Milbradt, J., S. Auerochs, K. Korn, and M. Marschall.** 2009. Sensitivity of human herpesvirus 6 and other human herpesviruses to the broad-spectrum anti-infective drug artesunate. *J Clin Virol.*

-
207. **Milbradt, J., R. Webel, S. Auerochs, H. Sticht, and M. Marschall.** 2010. Novel mode of phosphorylation-triggered reorganization of the nuclear lamina during nuclear egress of human cytomegalovirus. *J.Biol.Chem.*
208. **Miller, M. S., and L. Hertel.** 2009. Onset of human cytomegalovirus replication in fibroblasts requires the presence of an intact vimentin cytoskeleton. *J Virol* **83**:7015-28.
209. **Milne, I., M. Bayer, L. Cardle, P. Shaw, G. Stephen, F. Wright, and D. Marshall.** 2010. Tablet--next generation sequence assembly visualization. *Bioinformatics* **26**:401-2.
210. **Mocarski, E. S. a. C., C.T. .** 2001. In *Fields virology*, vol. D.M. Knipe and P.M. Howley. Lippincott-William & Wilkins, Philadelphia, PA.
211. **Murph, J. R., J. F. Bale, Jr., J. C. Murray, M. F. Stinski, and S. Perlman.** 1986. Cytomegalovirus transmission in a Midwest day care center: possible relationship to child care practices. *J Pediatr* **109**:35-9.
212. **Murphy, E., and T. Shenk.** 2008. Human cytomegalovirus genome. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* **325**:1-19.
213. **Murphy, E., D. Yu, J. Grimwood, J. Schmutz, M. Dickson, M. A. Jarvis, G. Hahn, J. A. Nelson, R. M. Myers, and T. E. Shenk.** 2003. Coding potential of laboratory and clinical strains of human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:14976-81.
214. **Murphy, K. C.** 1998. Use of bacteriophage lambda recombination functions to promote gene replacement in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **180**:2063-71.
215. **Murphy, K. C., K. G. Campellone, and A. R. Poteete.** 2000. PCR-mediated gene replacement in *Escherichia coli*. *Gene* **246**:321-30.
216. **Muyrers, J. P., Y. Zhang, and A. F. Stewart.** 2000. ET-cloning: think recombination first. *Genet Eng (N Y)* **22**:77-98.
217. **Nadal, M., P. J. Mas, A. G. Blanco, C. Arnan, M. Sola, D. J. Hart, and M. Coll.** 2010. Structure and inhibition of herpesvirus DNA packaging terminase nuclease domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:16078-83.
218. **Newcomb, W. W., S. K. Cockrell, F. L. Homa, and J. C. Brown.** 2009. Polarized DNA ejection from the herpesvirus capsid. *J Mol Biol* **392**:885-94.
219. **Newcomb, W. W., F. L. Homa, D. R. Thomsen, B. L. Trus, N. Cheng, A. Steven, F. Booy, and J. C. Brown.** 1999. Assembly of the herpes simplex virus procapsid from purified components and identification of small complexes containing the major capsid and scaffolding proteins. *J.Virol.* **73**:4239-4250.
220. **Nichols, W. G., L. Corey, T. Gooley, C. Davis, and M. Boeckh.** 2002. High risk of death due to bacterial and fungal infection among cytomegalovirus (CMV)-seronegative recipients of stem cell transplants from seropositive donors: evidence for indirect effects of primary CMV infection. *J.Infect.Dis.* **185**:273-282.

221. **Nicholson, P., C. Addison, A. M. Cross, J. Kennard, V. G. Preston, and F. J. Rixon.** 1994. Localization of the herpes simplex virus type 1 major capsid protein VP5 to the cell nucleus requires the abundant scaffolding protein VP22a. *J Gen Virol* **75 (Pt 5)**:1091-9.
222. **Nixon, D. E., and M. A. McVoy.** 2004. Dramatic effects of 2-bromo-5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosyl benzimidazole riboside on the genome structure, packaging, and egress of guinea pig cytomegalovirus. *J.Virol.* **78**:1623-1635.
223. **Nixon, D. E., and M. A. McVoy.** 2002. Terminally repeated sequences on a herpesvirus genome are deleted following circularization but are reconstituted by duplication during cleavage and packaging of concatemeric DNA. *J Virol.* **76**:2009-2013.
224. **Ogawa-Goto, K., K. Tanaka, W. Gibson, E. Moriishi, Y. Miura, T. Kurata, S. Irie, and T. Sata.** 2003. Microtubule network facilitates nuclear targeting of human cytomegalovirus capsid. *J Virol* **77**:8541-7.
225. **Painter, R. G., Trost, C.L., Lampert, M.B., Almond, R.M., Buller, M., Kern, E., Painter, G.P., Robertson, A.T., Frazer, N., O' Mahony, R.** 2008. CMX001. Anti-smallpox agent, anti-cytomegalovirus agent, viral polymerase inhibitor. *Drugs Fut* 2008 **33 (8)**:655.
226. **Pass, R. F., K. B. Fowler, S. B. Boppana, W. J. Britt, and S. Stagno.** 2006. Congenital cytomegalovirus infection following first trimester maternal infection: Symptoms at birth and outcome. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* **35**:216-220.
227. **Pawelec, G., E. Derhovanessian, A. Larbi, J. Strindhall, and A. Wikby.** 2009. Cytomegalovirus and human immunosenescence. *Rev Med Virol* **19**:47-56.
228. **Paya, P. S. a. C. V.** 2007. Pathogenesis in Transplant Recipients, p. 7:1 - 7:14. *In* V. C. Emery (ed.), *Human Virus Guides* 3 vol. 1 International Medical Press London.
229. **Penfold, M. E., and E. S. Mocarski.** 1997. Formation of cytomegalovirus DNA replication compartments defined by localization of viral proteins and DNA synthesis. *Virology* **239**:46-61.
230. **Pereira, L., and E. Maidji.** 2008. Cytomegalovirus infection in the human placenta: maternal immunity and developmentally regulated receptors on trophoblasts converge. *Curr Top Microbiol Immunol* **325**:383-95.
231. **Perlman, J. M., and C. Argyle.** 1992. Lethal cytomegalovirus infection in preterm infants: clinical, radiological, and neuropathological findings. *Ann Neurol* **31**:64-8.
232. **Petrie, B. L., E. Adam, and J. L. Melnick.** 1988. Association of herpesvirus/cytomegalovirus infections with human atherosclerosis. *Prog Med Virol* **35**:21-42.
233. **Pettersen, E. F., T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, and T. E. Ferrin.** 2004. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **25**:1605-12.
234. **Plachter, B., C. Sinzger, and G. Jahn.** 1996. Cell types involved in replication and distribution of human cytomegalovirus. *Adv Virus Res* **46**:195-261.

235. **Plafker, S. M., and W. Gibson.** 1998. Cytomegalovirus assembly protein precursor and proteinase precursor contain two nuclear localization signals that mediate their own nuclear translocation and that of the major capsid protein. *J.Virol.* **72**:7722-7732.
236. **Plotkin, S. A., T. Furukawa, N. Zygraich, and C. Huygelen.** 1975. Candidate cytomegalovirus strain for human vaccination. *Infect Immun* **12**:521-7.
237. **Post, L. E., and B. Roizman.** 1981. A generalized technique for deletion of specific genes in large genomes: alpha gene 22 of herpes simplex virus 1 is not essential for growth. *Cell* **25**:227-32.
238. **Potena, L., F. Grigioni, G. Magnani, T. Lazzarotto, A. C. Musuraca, P. Ortolani, F. Cocco, F. Fallani, A. Russo, and A. Branzi.** 2009. Prophylaxis versus preemptive anti-cytomegalovirus approach for prevention of allograft vasculopathy in heart transplant recipients. *J.Heart Lung Transplant.* **28**:461-467.
239. **Price, N. B., and M. N. Prichard.** 2011. Progress in the Development of New Therapies for Herpesvirus Infections. *Curr Opin Virol* **1**:548-554.
240. **Prichard, M. N., E. R. Kern, C. B. Hartline, E. R. Lanier, and D. C. Quenelle.** 2011. CMX001 potentiates the efficacy of acyclovir in herpes simplex virus infections. *Antimicrob Agents Chemother* **55**:4728-34.
241. **Quenelle, D. C., B. Lampert, D. J. Collins, T. L. Rice, G. R. Painter, and E. R. Kern.** Efficacy of CMX001 against herpes simplex virus infections in mice and correlations with drug distribution studies. *J Infect Dis* **202**:1492-9.
242. **Quenelle, D. C., B. Lampert, D. J. Collins, T. L. Rice, G. R. Painter, and E. R. Kern.** 2010. Efficacy of CMX001 against herpes simplex virus infections in mice and correlations with drug distribution studies. *J Infect Dis* **202**:1492-9.
243. **Radsak, K., K. H. Brucher, W. Britt, H. Shiou, D. Schneider, and A. Kollert.** 1990. Nuclear compartmentation of glycoprotein B of human cytomegalovirus. *Virology* **177**:515-22.
244. **Reefschlaeger, J., W. Bender, S. Hallenberger, O. Weber, P. Eckenberg, S. Goldmann, M. Haerter, I. Buerger, J. Trappe, J. A. Herrington, D. Haebich, and H. Ruebsamen-Waigmann.** 2001. Novel non-nucleoside inhibitors of cytomegaloviruses (BAY 38-4766): in vitro and in vivo antiviral activity and mechanism of action. *J.Antimicrob.Chemother.* **48**:757-767.
245. **Release, A. P.** 2012. AiCuris Drug Letermovir (AIC246) meets primary efficacy endpoints in phase 2 for human cytomegalovirus (HCMV) prophylaxis in human blood precursor cell recipients. http://www.aicuris.com/10d69/News_Publications.htm.
246. **Reynolds, D. W., S. Stagno, T. S. Hosty, M. Tiller, and C. A. Alford, Jr.** 1973. Maternal cytomegalovirus excretion and perinatal infection. *N Engl J Med* **289**:1-5.
247. **Ribbert H., J. A.** 1904. Über protozoenartige Zellen in der Niere eines syphilitischen Neugeborenen und in der Parotis von Kindern, vol. 15.
248. **Roizman, B. a. D. M. K.** 2001. Herpes Simplex Viruses and Their Replication, Fourth Edition ed. Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.

249. **Roizmann, B., R. C. Desrosiers, B. Fleckenstein, C. Lopez, A. C. Minson, and M. J. Studdert.** 1992. The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol* **123**:425-49.
250. **Rubin, R. H.** 2001. Cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transpl Infect Dis* **3 Suppl 2**:1-5.
251. **Rubin, R. H.** 2000. Prevention of cytomegalovirus infection in organ transplant recipients. *Transpl Infect Dis* **2**:99-100.
252. **Russell, S. a.** 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd ed ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor N.Y., USA.
253. **Ryckman, B. J., M. A. Jarvis, D. D. Drummond, J. A. Nelson, and D. C. Johnson.** 2006. Human cytomegalovirus entry into epithelial and endothelial cells depends on genes UL128 to UL150 and occurs by endocytosis and low-pH fusion. *J Virol* **80**:710-22.
254. **Saad, A., Z. H. Zhou, J. Jakana, W. Chiu, and F. J. Rixon.** 1999. Roles of triplex and scaffolding proteins in herpes simplex virus type 1 capsid formation suggested by structures of recombinant particles. *J Virol* **73**:6821-30.
255. **Sagedal, S., K. P. Nordal, A. Hartmann, S. Sund, H. Scott, M. Degre, A. Foss, T. Leivestad, K. Osnes, P. Fauchald, and H. Rollag.** 2002. The impact of cytomegalovirus infection and disease on rejection episodes in renal allograft recipients. *Am J Transplant* **2**:850-6.
256. **Sakaki, Y., A. E. Karu, S. Linn, and H. Echols.** 1973. Purification and properties of the gamma-protein specified by bacteriophage lambda: an inhibitor of the host RecBC recombination enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**:2215-9.
257. **Sampaio, K. L., Y. Cavignac, Y. D. Stierhof, and C. Sinzger.** 2005. Human cytomegalovirus labeled with green fluorescent protein for live analysis of intracellular particle movements. *J. Virol.* **79**:2754-2767.
258. **Sanchez, V., K. D. Greis, E. Sztul, and W. J. Britt.** 2000. Accumulation of virion tegument and envelope proteins in a stable cytoplasmic compartment during human cytomegalovirus replication: characterization of a potential site of virus assembly. *J Virol* **74**:975-86.
259. **Schaffer, P. A.** 1975. Temperature-sensitive mutants of herpesviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **70**:51-100.
260. **Scheffczik, H., C. G. Savva, A. Holzenburg, L. Kolesnikova, and E. Bogner.** 2002. The terminase subunits pUL56 and pUL89 of human cytomegalovirus are DNA-metabolizing proteins with toroidal structure. *Nucleic Acids Res.* **30**:1695-1703.
261. **Schleiss, M. R.** 2008. Congenital Cytomegalovirus Infection: Update on Management Strategies. *Curr.Treat.Options.Neurol.* **10**:186-192.
262. **Schleiss, M. R.** 2008. Cytomegalovirus vaccine development. *Curr Top Microbiol Immunol* **325**:361-82.

263. **Schleiss, M. R., and T. C. Heineman.** 2005. Progress toward an elusive goal: current status of cytomegalovirus vaccines. *Expert Rev Vaccines* **4**:381-406.
264. **Schneeberger, S., S. Lucchina, M. Lanzetta, G. Brandacher, C. Bosmuller, W. Steurer, F. Baldanti, C. Dezza, R. Margreiter, and H. Bonatti.** 2005. Cytomegalovirus-related complications in human hand transplantation. *Transplantation* **80**:441-7.
265. **Scholz, B., S. Rechter, J. C. Drach, L. B. Townsend, and E. Bogner.** 2003. Identification of the ATP-binding site in the terminase subunit pUL56 of human cytomegalovirus. *Nucleic Acids Res.* **31**:1426-1433.
266. **Scrivano, L., J. Esterlechner, H. Muhlbach, N. Ettischer, C. Hagen, K. Grunewald, C. A. Mohr, Z. Ruzsics, U. Koszinowski, and B. Adler.** The m74 gene product of murine cytomegalovirus (MCMV) is a functional homolog of human CMV gO and determines the entry pathway of MCMV. *J.Virol.* **84**:4469-4480.
267. **Sellese, D. W., C. L. Talarico, T. Miller, M. W. Lutz, K. K. Biron, and R. J. Harvey.** 2003. Interactions of 1263W94 with other antiviral agents in inhibition of human cytomegalovirus replication. *Antimicrob.Agents Chemother.* **47**:1468-1471.
268. **Seo, J. Y., and W. J. Britt.** 2007. Cytoplasmic envelopment of human cytomegalovirus requires the postlocalization function of tegument protein pp28 within the assembly compartment. *J Virol* **81**:6536-47.
269. **Shapira, M. Y., I. B. Resnick, S. Chou, A. U. Neumann, N. S. Lurain, T. Stamminger, O. Caplan, N. Saleh, T. Efferth, M. Marschall, and D. G. Wolf.** 2008. Artesunate as a potent antiviral agent in a patient with late drug-resistant cytomegalovirus infection after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect.Dis.* **46**:1455-1457.
270. **Sheaffer, A. K., W. W. Newcomb, M. Gao, D. Yu, S. K. Weller, J. C. Brown, and D. J. Tenney.** 2001. Herpes simplex virus DNA cleavage and packaging proteins associate with the procapsid prior to its maturation. *J Virol* **75**:687-98.
271. **Shenk, T. E., M. F. Stinski, and W. Gibson.** 2008. Structure and Formation of the Cytomegalovirus Virion, p. 187-204, *Human Cytomegalovirus*, vol. 325. Springer Berlin Heidelberg.
272. **Shenk, T. E., M. F. Stinski, M. K. Isaacson, L. K. Juckem, and T. Compton.** 2008. Virus Entry and Innate Immune Activation, p. 85-100, *Human Cytomegalovirus*, vol. 325. Springer Berlin Heidelberg.
273. **Shenk, T. E., M. F. Stinski, and G. G. Maul.** 2008. Initiation of Cytomegalovirus Infection at ND10, p. 117-132, *Human Cytomegalovirus*, vol. 325. Springer Berlin Heidelberg.
274. **Shenk, T. E., M. F. Stinski, and G. S. Pari.** 2008. Nuts and Bolts of Human Cytomegalovirus Lytic DNA Replication, p. 153-166, *Human Cytomegalovirus*, vol. 325. Springer Berlin Heidelberg.
275. **Shenk, T. E., M. F. Stinski, C. Sinzger, M. Digel, and G. Jahn.** 2008. Cytomegalovirus Cell Tropism, p. 63-83, *Human Cytomegalovirus*, vol. 325. Springer Berlin Heidelberg.

276. **Shizuya, H., B. Birren, U. J. Kim, V. Mancino, T. Slepak, Y. Tachiiri, and M. Simon.** 1992. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:8794-7.
277. **Sinclair, J., and P. Sissons.** 2006. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J Gen Virol* **87**:1763-79.
278. **Singer, G. P., W. W. Newcomb, D. R. Thomsen, F. L. Homa, and J. C. Brown.** 2005. Identification of a region in the herpes simplex virus scaffolding protein required for interaction with the portal. *J Virol* **79**:132-9.
279. **Sinzger, C.** 2008. Entry route of HCMV into endothelial cells. *J.Clin Virol*.
280. **Sinzger, C., and G. Jahn.** 1996. Human cytomegalovirus cell tropism and pathogenesis. *Intervirolgy* **39**:302-19.
281. **Smith, M. G., and F. Vellios.** 1950. Inclusion disease or generalized salivary gland virus infection. *AMA Arch Pathol* **50**:862-84.
282. **Snydman, D. R.** 2006. The case for cytomegalovirus prophylaxis in solid organ transplantation. *Rev.Med.Virol.* **16**:289-295.
283. **Snydman, D. R.** Why did maribavir fail in stem-cell transplants? *Lancet Infect.Dis.*
284. **Soma, M. A., and D. M. Albert.** 2008. Cidofovir: to use or not to use? *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* **16**:86-90.
285. **Soroceanu, L., A. Akhavan, and C. S. Cobbs.** 2008. Platelet-derived growth factor-alpha receptor activation is required for human cytomegalovirus infection. *Nature* **455**:391-395.
286. **Soroceanu, L., and C. S. Cobbs.** 2011. Is HCMV a tumor promoter? *Virus Research* **157**:193-203.
287. **Spaete, R. R., and E. S. Mocarski.** 1985. The alpha sequence of the cytomegalovirus genome functions as a cleavage/packaging signal for herpes simplex virus defective genomes. *J Virol* **54**:817-24.
288. **Spencer, J. V., B. L. Trus, F. P. Booy, A. C. Steven, W. W. Newcomb, and J. C. Brown.** 1997. Structure of the herpes simplex virus capsid: peptide A862-H880 of the major capsid protein is displayed on the rim of the capsomer protrusions. *Virology* **228**:229-35.
289. **Springer, K. L., and A. Weinberg.** 2004. Cytomegalovirus infection in the era of HAART: fewer reactivations and more immunity. *J Antimicrob Chemother* **54**:582-6.
290. **Stagno, S., D. W. Reynolds, A. Lakeman, L. J. Charamella, and C. A. Alford.** 1973. Congenital cytomegalovirus infection: consecutive occurrence due to viruses with similar antigenic compositions. *Pediatrics* **52**:788-94.
291. **Stagno, S., D. W. Reynolds, A. Tsiantos, D. A. Fuccillo, W. Long, and C. A. Alford.** 1975. Comparative serial virologic and serologic studies of symptomatic and subclinical congenitally and natally acquired cytomegalovirus infections. *J Infect Dis* **132**:568-77.

-
292. **Stamminger, T.** 1997. Zytomegalievirus-Infektionen nach Transplantationen. Deutsches Ärzteblatt **94**:168-173.
293. **Steen, R. L., S. B. Martins, K. Tasken, and P. Collas.** 2000. Recruitment of protein phosphatase 1 to the nuclear envelope by A-kinase anchoring protein AKAP149 is a prerequisite for nuclear lamina assembly. *J Cell Biol* **150**:1251-62.
294. **Steininger, C.** 2007. Novel therapies for cytomegalovirus disease. *Recent Patents.Anti-Infect.Drug Disc.* **2**:53-72.
295. **Steininger, C., E. Puchhammer-Stockl, and T. Popow-Kraupp.** 2006. Cytomegalovirus disease in the era of highly active antiretroviral therapy (HAART). *J.Clin.Virol.* **37**:1-9.
296. **Sternberg, N.** 1990. Bacteriophage P1 cloning system for the isolation, amplification, and recovery of DNA fragments as large as 100 kilobase pairs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:103-7.
297. **Steven, A. C., and P. G. Spear.** 1997. *Structural biology of viruses.* . Oxford University Press, New York, N.Y.
298. **Streblow, D. N., and J. A. Nelson.** 2003. Models of HCMV latency and reactivation. *Trends Microbiol.* **11**:293-295.
299. **Stuurman, N., S. Heins, and U. Aebi.** 1998. Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions. *J Struct Biol* **122**:42-66.
300. **Sung, H., and M. R. Schleiss.** 2010. Update on the current status of cytomegalovirus vaccines. *Expert.Rev.Vaccines.* **9**:1303-1314.
301. **Tamashiro, J. C., and D. H. Spector.** 1986. Terminal structure and heterogeneity in human cytomegalovirus strain AD169. *J Virol.* **59**:591-604.
302. **Tandon, R., and E. S. Mocarski.** 2011. Cytomegalovirus pUL96 is critical for the stability of pp150-associated nucleocapsids. *J Virol* **85**:7129-41.
303. **Tatarowicz, W. A., N. S. Lurain, and K. D. Thompson.** 1992. A ganciclovir-resistant clinical isolate of human cytomegalovirus exhibiting cross-resistance to other DNA polymerase inhibitors. *J Infect Dis* **166**:904-7.
304. **Tavares, P., R. Lurz, A. Stiege, B. Ruckert, and T. A. Trautner.** 1996. Sequential headful packaging and fate of the cleaved DNA ends in bacteriophage SPP1. *J Mol Biol* **264**:954-67.
305. **Taylor-Wiedeman, J., J. G. Sissons, L. K. Borysiewicz, and J. H. Sinclair.** 1991. Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *J Gen Virol* **72 (Pt 9)**:2059-64.
306. **Thomas, L. D., A. P. Milstone, G. G. Miller, J. E. Loyd, and J. Stephen Dummer.** 2009. Long-term outcomes of cytomegalovirus infection and disease after lung or heart-lung transplantation with a delayed ganciclovir regimen. *Clin Transplant* **23**:476-83.
307. **Tischer, B. K., G. A. Smith, and N. Osterrieder.** 2010. En Passant Mutagenesis: A Two Step Markerless Red Recombination System, p. 421-430, vol. 634.

308. **Tischer, B. K., E. J. von, B. Kaufer, and N. Osterrieder.** 2006. Two-step red-mediated recombination for versatile high-efficiency markerless DNA manipulation in *Escherichia coli*. *Biotechniques* **40**:191-197.
309. **Tomicic, M. T., E. Bey, P. Wutzler, R. Thust, and B. Kaina.** 2002. Comparative analysis of DNA breakage, chromosomal aberrations and apoptosis induced by the anti-herpes purine nucleoside analogues aciclovir, ganciclovir and penciclovir. *Mutat Res* **505**:1-11.
310. **Trus, B. L., F. P. Booy, W. W. Newcomb, J. C. Brown, F. L. Homa, D. R. Thomsen, and A. C. Steven.** 1996. The herpes simplex virus procapsid: structure, conformational changes upon maturation, and roles of the triplex proteins VP19c and VP23 in assembly. *J Mol Biol* **263**:447-62.
311. **Trus, B. L., J. B. Heymann, K. Nealon, N. Cheng, W. W. Newcomb, J. C. Brown, D. H. Kedes, and A. C. Steven.** 2001. Capsid structure of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, a gammaherpesvirus, compared to those of an alphaherpesvirus, herpes simplex virus type 1, and a betaherpesvirus, cytomegalovirus. *J Virol* **75**:2879-90.
312. **Trus, B. L., F. L. Homa, F. P. Booy, W. W. Newcomb, D. R. Thomsen, N. Cheng, J. C. Brown, and A. C. Steven.** 1995. Herpes simplex virus capsids assembled in insect cells infected with recombinant baculoviruses: structural authenticity and localization of VP26. *J Virol* **69**:7362-6.
313. **Underwood, M. R., R. J. Harvey, S. C. Stanat, M. L. Hemphill, T. Miller, J. C. Drach, L. B. Townsend, and K. K. Biron.** 1998. Inhibition of human cytomegalovirus DNA maturation by a benzimidazole ribonucleoside is mediated through the UL89 gene product. *J.Virol.* **72**:717-725.
314. **van Zijl, M., W. Quint, J. Briaire, T. de Rover, A. Gielkens, and A. Berns.** 1988. Regeneration of herpesviruses from molecularly cloned subgenomic fragments. *J Virol* **62**:2191-5.
315. **Varnum, S. M., D. N. Streblow, M. E. Monroe, P. Smith, K. J. Auberry, L. Pasa-Tolic, D. Wang, D. G. Camp, K. Rodland, S. Wiley, W. Britt, T. Shenk, R. D. Smith, and J. A. Nelson.** 2004. Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *J.Virol.* **78**:10960-10966.
316. **ViroPharma.** 2009. ViroPharma Announces Discontinuation of Maribavir Phase 3 Study in Liver Transplant Patients. <http://ir.viropharma.com/releasedetail.cfm?releaseid=543167>. ViroPharma.
317. **Vistide package insert.** 1996. Vistide (cidofovir injection) package insert. Gilead Sciences Inc., 1996.
318. **Wagstaff, A. J., and H. M. Bryson.** 1994. Foscarnet. A reappraisal of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use in immunocompromised patients with viral infections. *Drugs* **48**:199-226.
319. **Wahren, B., A. Larsson, U. Ruden, A. Sundqvist, and E. Solver.** 1987. Acyclic guanosine analogs as inhibitors of human cytomegalovirus. *Antimicrob Agents Chemother* **31**:317-20.
320. **Wang, D., and T. Shenk.** 2005. Human cytomegalovirus virion protein complex required for epithelial and endothelial cell tropism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:18153-8.

321. **Wang, K., G. Mahalingam, S. E. Hoover, E. K. Mont, S. M. Holland, J. I. Cohen, and S. E. Straus.** 2007. Diverse herpes simplex virus type 1 thymidine kinase mutants in individual human neurons and Ganglia. *J Virol.* **81**:6817-6826.
322. **Wang, L. H., R. W. Peck, Y. Yin, J. Allanson, R. Wiggs, and M. B. Wire.** 2003. Phase I safety and pharmacokinetic trials of 1263W94, a novel oral anti-human cytomegalovirus agent, in healthy and human immunodeficiency virus-infected subjects. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:1334-1342.
323. **Wang, X., D. Y. Huang, S. M. Huong, and E. S. Huang.** 2005. Integrin alphavbeta3 is a coreceptor for human cytomegalovirus. *Nat Med* **11**:515-21.
324. **Wang, X., S. M. Huong, M. L. Chiu, N. Raab-Traub, and E. S. Huang.** 2003. Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature* **424**:456-61.
325. **Wathen, M. W., and M. F. Stinski.** 1982. Temporal patterns of human cytomegalovirus transcription: mapping the viral RNAs synthesized at immediate early, early, and late times after infection. *J Virol* **41**:462-77.
326. **Welch, A. R., L. M. McNally, and W. Gibson.** 1991. Cytomegalovirus assembly protein nested gene family: four 3'-coterminal transcripts encode four in-frame, overlapping proteins. *J Virol* **65**:4091-100.
327. **Weller, T. H.** 1971. The cytomegaloviruses: ubiquitous agents with protean clinical manifestations. I. *N Engl J Med* **285**:203-14.
328. **Weller, T. H.** 1971. The cytomegaloviruses: ubiquitous agents with protean clinical manifestations. II. *N Engl J Med* **285**:267-74.
329. **Williams-Aziz, S. L., C. B. Hartline, E. A. Harden, S. L. Daily, M. N. Prichard, N. L. Kushner, J. R. Beadle, W. B. Wan, K. Y. Hostetler, and E. R. Kern.** 2005. Comparative activities of lipid esters of cidofovir and cyclic cidofovir against replication of herpesviruses in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:3724-33.
330. **Wiltshire, H., S. Hirankarn, C. Farrell, C. Paya, M. D. Pescovitz, A. Humar, E. Dominguez, K. Washburn, E. Blumberg, B. Alexander, R. Freeman, and N. Heaton.** 2005. Pharmacokinetic profile of ganciclovir after its oral administration and from its prodrug, valganciclovir, in solid organ transplant recipients. *Clin Pharmacokinet* **44**:495-507.
331. **Wolf, D. G., C. T. Courcelle, M. N. Prichard, and E. S. Mocarski.** 2001. Distinct and separate roles for herpesvirus-conserved UL97 kinase in cytomegalovirus DNA synthesis and encapsidation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:1895-900.
332. **Wolf, D. G., A. Shimoni, I. B. Resnick, T. Stamminger, A. U. Neumann, S. Chou, T. Efferth, O. Caplan, J. Rose, A. Nagler, and M. Marschall.** 2011. Human cytomegalovirus kinetics following institution of artesunate after hematopoietic stem cell transplantation. *Antiviral Res* **90**:183-6.
333. **Wood, L. J., M. K. Baxter, S. M. Plafker, and W. Gibson.** 1997. Human cytomegalovirus capsid assembly protein precursor (pUL80.5) interacts with itself and with the major capsid protein (pUL86) through two different domains. *J. Virol.* **71**:179-190.

334. **Wu, L., P. Lo, X. Yu, J. K. Stoops, B. Forghani, and Z. H. Zhou.** 2000. Three-dimensional structure of the human herpesvirus 8 capsid. *J Virol* **74**:9646-54.
335. **Wu, Z., X. Xing, C. E. Bohl, J. W. Wisler, J. T. Dalton, and C. E. Bell.** 2006. Domain structure and DNA binding regions of beta protein from bacteriophage lambda. *J Biol Chem* **281**:25205-14.
336. **Yang, Z., K. Lasker, D. Schneidman-Duhovny, B. Webb, C. C. Huang, E. F. Pettersen, T. D. Goddard, E. C. Meng, A. Sali, and T. E. Ferrin.** 2011. UCSF Chimera, MODELLER, and IMP: An integrated modeling system. *J Struct Biol*.
337. **Yu, X., S. Shah, I. Atanasov, P. Lo, F. Liu, W. J. Britt, and Z. H. Zhou.** 2005. Three-dimensional localization of the smallest capsid protein in the human cytomegalovirus capsid. *J.Virol.* **79**:1327-1332.
338. **Yu, X., P. Trang, S. Shah, I. Atanasov, Y. H. Kim, Y. Bai, Z. H. Zhou, and F. Liu.** 2005. Dissecting human cytomegalovirus gene function and capsid maturation by ribozyme targeting and electron cryomicroscopy. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **102**:7103-7108.
339. **Zagursky, R. J., and J. B. Hays.** 1983. Expression of the phage lambda recombination genes *exo* and *bet* under *lacPO* control on a multi-copy plasmid. *Gene* **23**:277-92.
340. **Zaia, J. A.** 1990. Epidemiology and pathogenesis of cytomegalovirus disease. *Semin Hematol* **27**:5-10; discussion 28-9.
341. **Zhang, Y., J. P. Muyrers, J. Rientjes, and A. F. Stewart.** 2003. Phage annealing proteins promote oligonucleotide-directed mutagenesis in *Escherichia coli* and mouse ES cells. *BMC Mol Biol* **4**:1.
342. **Zhang, Y., J. P. Muyrers, G. Testa, and A. F. Stewart.** 2000. DNA cloning by homologous recombination in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* **18**:1314-7.
343. **Zhou, F. L. a. Z. H.** 2007. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis.* Cambridge University Press, Cambridge.
344. **Zhou, S., J. M. Breitenbach, K. Z. Borysko, J. C. Drach, E. R. Kern, E. Gullen, Y. C. Cheng, and J. Zemlicka.** 2004. Synthesis and antiviral activity of (Z)- and (E)-2,2-[bis(hydroxymethyl)cyclopropylidene]methylpurines and -pyrimidines: second-generation methylenecyclopropane analogues of nucleosides. *J Med Chem* **47**:566-75.
345. **Zhou, Z. H., M. L. Baker, W. Jiang, M. Dougherty, J. Jakana, G. Dong, G. Lu, and W. Chiu.** 2001. Electron cryomicroscopy and bioinformatics suggest protein fold models for rice dwarf virus. *Nat Struct Biol* **8**:868-73.
346. **Zhou, Z. H., M. Dougherty, J. Jakana, J. He, F. J. Rixon, and W. Chiu.** 2000. Seeing the herpesvirus capsid at 8.5 Å. *Science* **288**:877-80.
347. **Zhou, Z. H., S. J. Macnab, J. Jakana, L. R. Scott, W. Chiu, and F. J. Rixon.** 1998. Identification of the sites of interaction between the scaffold and outer shell in herpes simplex virus-1 capsids by difference electron imaging. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**:2778-2783.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Struktur des HCMV-Virions	3
Abb. 2:	Die HCMV-Genomorganisation	4
Abb. 3:	Der HCMV-Replikationszyklus.....	5
Abb. 4:	Die virale Genexpression und Funktion der viralen Proteine im Rahmen des HCMV-Replikationszyklus.....	6
Abb. 5:	Struktur des HCMV-Nukleokapsids	8
Abb. 6:	Schematische Darstellung der HCMV-Nukleokapsid-Assemblierung	9
Abb. 7:	Schematische Darstellung der Verpackung des viralen HCMV-Genoms in das Nukleokapsid.....	11
Abb. 8:	Molekülstrukturen der zugelassenen antiviralen HCMV-Substanzen.....	18
Abb. 9:	HCMV-Terminaseinhibitoren.....	21
Abb. 10:	Maribavir	22
Abb. 11:	Gegen HCMV antiviral aktive Substanzen in der klinischen Entwicklung	24
Abb. 12:	Chemische Struktur von AIC246 (C ₂₉ H ₂₈ F ₄ N ₄ O ₄).....	26
Abb. 13:	Dosis-Wirkungskurven der Substanzen AIC246 (A), AIC2 (B) und AIC3 (C) im Vergleich zu Ganciclovir (D).....	27
Abb. 14:	Schematische Darstellung der Insertion des Selektionsmarkers während der ersten Red-Rekombination.....	47
Abb. 15:	Schematische Darstellung der zweiten Red-Rekombination.....	48
Abb. 16:	Schematische Abbildung der Primergenerierung für die Insertion von Punktmutationen	49
Abb. 17:	Bestimmung des Zeitpunkts des inhibitorischen Effekts der Substanzen AIC246, AIC2, AIC3, Bay 38-4766 und GCV innerhalb des HCMV-Replikationszyklus	58
Abb. 18:	HCMV DNA-Replikation in Anwesenheit von AIC246, AIC2, AIC3 bzw. GCV.....	60
Abb. 19:	Einfluss der Substanzen AIC246, AIC2 bzw. AIC3 auf die Proteinexpression und -akkumulation im Vergleich zu Ganciclovir	61
Abb. 20:	Analyse der intrazellulären Verteilung von IE- und E-Markerproteinen unter Einfluss von AIC246, AIC2 bzw. AIC3	63
Abb. 21:	Analyse der intrazellulären Verteilung des L-Strukturproteins MCP unter Einfluss von AIC246, AIC2 bzw. AIC3	64
Abb. 22:	Analyse der intrazellulären Verteilung des L-Strukturproteins SCP in Anwesenheit von AIC246, AIC2 bzw. AIC3	66
Abb. 23:	Darstellung der intrazellulären Lokalisation von transient exprimiertem MCP in HeLa-Zellen in An- bzw. Abwesenheit von AIC2 bzw. AIC3.....	68
Abb. 24:	Intrazelluläre Lokalisation von kotransfiziertem MCP/pPR bzw. MCP/pAP in HeLa-Zellen in An- und Abwesenheit von AIC2 bzw. AIC3	69
Abb. 25:	Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Analyse HCMV-infizierter, mit Placebo (VK), AIC246, AIC2 bzw. AIC3 versehener HFF- bzw. HUVEC-Zellen.....	70
Abb. 26:	Restriktionsanalyse der Bacmid-DNA aus <i>E. coli</i> pHG-GS1783	78
Abb. 27:	HCMV-UL56-R369S-Nukleotidsubstitution: Kolonie-PCR zur Überprüfung der ersten Red-Rekombination der pHG-UL56-R369S-Integrianten.....	79

Abb. 28:	HCMV-UL56-R369S-Nukleotidsubstitution: RFLP-Analyse zur Überprüfung der ersten Red-Rekombination der pHG-UL56-R369S-Integranen.....	80
Abb. 29:	HCMV-UL56-R369S-Nukleotidsubstitution: Kolonie-PCR zur Analyse der zweiten Red-Rekombination.....	81
Abb. 30:	HCMV-UL56-R369S-Nukleotidsubstitution: RFLP-Analyse zur Überprüfung der Rekombinanten der zweiten Red-Rekombination.....	81
Abb. 31:	Insertion von potentiell AIC246-Resistenz vermittelnden Nukleotidsubstitutionen in den UL56-Leserahmen.....	83
Abb. 32:	Insertion von potentiell AIC2- bzw. AIC3-Resistenz vermittelnden Nukleotidsubstitutionen in den UL86-Leserahmen.....	84
Abb. 33:	Mehrschritt-Wachstumskinetik der rekombinanten UL56- (A) bzw. UL86-Virusmutanten (B).....	86
Abb. 34:	Virusrekonstitution von RV-HG und RV-HG-UL86-R583L in An- und Abwesenheit von AIC2.....	91
Abb. 35:	Markertransfer und Wachstumskinetik der RV-HG-UL86-R583L-Revertante.....	92
Abb. 36:	Fokus-Expansion der Virusmutanten RV-HG-UL86-R583L Klon 1 und Klon 2 in An- und Abwesenheit von AIC2 bzw. AIC3 im Vergleich zu RV-HG.....	94
Abb. 37:	Mehrschritt-Wachstumskinetik von RV-HG-UL86-R583L Klon 2 in An- und Abwesenheit von AIC2.....	95
Abb. 38:	Sequenzanalyse von RV-HG und den rekombinanten Virusmutanten RV-HG-UL86-R583L Klon 1 und Klon 2.....	97
Abb. 39:	Vergleich der Nukleokapsidstrukturen von HSV-1 und HCMV.....	99
Abb. 40:	MAFFT-Alignment der VP5- bzw. UL86-Aminosäuresequenz, verbunden mit einer PSIPRD-Sekundärstrukturanalyse.....	101
Abb. 41:	Aufbau des HSV-1-Hauptkapsidproteins VP5.....	103
Abb. 42:	Vergleich der Kristallstruktur der oberen Domäne von HSV-1 VP5 und des komparativen Strukturmodells der oberen Domäne von HCMV MCP.....	105
Abb. 43:	Vergleich der Interaktionsdomänen der Kristallstruktur der oberen Domäne von HSV-1 VP5 und des komparativen Strukturmodells der oberen Domäne von HCMV MCP.....	107
Abb. 44:	Darstellung der putativen Interaktionsdomänen der oberen Domäne von MCP innerhalb der Hexon- bzw. Penton-Konformation.....	108
Abb. 45:	Ausschnitt aus der putativen Interaktionsdomäne des Hexon- bzw. Penton-Kapsomers.....	110
Abb. 46:	Schematische Darstellung der pUL56-Domänenorganisation.....	114
Abb. 47:	Lokalisation der AIC2- bzw. AIC3-Resistenzmutationen innerhalb des HCMV-Hauptkapsidproteins MCP.....	119
Abb. 48:	Interaktion der Triplexe mit den Hexonen und Pentonen des HCMV-Nukleokapsids.....	122

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Taxonomie der humanpathogenen Herpesviren.....	1
Tab. 2:	Suszeptibilität des EGFP-exprimierenden AD169-Laborstamms RV-HG gegen AIC246, AIC2 bzw. AIC3 im Vergleich zu GCV in Fibroblasten	27
Tab. 3:	Verwendete Bakterienstämme (vgl. B.2.3)	32
Tab. 4:	Verwendete eukaryotische Zelllinien (vgl. B.2.1).....	32
Tab. 5:	Verwendete Virusstämme	32
Tab. 6:	Primer und Sonden für die <i>Real-Time</i> -PCR.....	33
Tab. 7:	Primer für die Sequenzanalyse 1	33
Tab. 8:	Primer für die Sequenzanalyse 2	34
Tab. 9:	Primer für die <i>En-passant</i> -Mutagenese	35
Tab. 10:	Primer für Klonierungen	35
Tab. 11:	Erhaltene und generierte Bacmide.....	36
Tab. 12:	Zur Verfügung gestellte Plasmide	36
Tab. 13:	Neu generierte Plasmide.....	36
Tab. 14:	Materialien für die eukaryotische Zellkultur.....	37
Tab. 15:	Materialien für die <i>En-passant</i> -Mutagenese, Klonierungen, Gelelektrophorese und <i>Real-Time</i> -PCR.....	38
Tab. 16:	Material für die Immunoblot- und Immunfluoreszenzanalyse	38
Tab. 17:	Material für die Isolierung von viraler DNA	39
Tab. 18:	Erstellte Puffer und Lösungen.....	39
Tab. 19:	Primäre Antikörper	39
Tab. 20:	Sekundäre Antikörper	40
Tab. 21:	Verwendete Geräte	41
Tab. 22:	Kulturmedien für die verwendeten eukaryotischen Zelllinien.....	42
Tab. 23:	Zyklusabfolge der <i>Touch-Down</i> -PCR	50
Tab. 24:	Zyklusabfolge der Standard-PCR	51
Tab. 25:	Zyklusabfolge der <i>Real-Time</i> -PCR	54
Tab. 26:	Einfluss von AIC246 auf die Kapsid-Reifung	71
Tab. 27:	Durch AIC246-Inkubation generierte resistente Virusstämme und deren Suszeptibilität gegen AIC246 bzw. GCV	72
Tab. 28:	Durch AIC2- bzw. AIC3-Inkubation generierte Virusstämme und deren Suszeptibilität gegen AIC2, AIC3 und GCV	73
Tab. 29:	Genotypen der generierten AIC246-resistenten Viren.....	75
Tab. 30:	Genotypen der generierten AIC2- bzw. AIC3-resistenten Viren	76
Tab. 31:	Mittels Markertransfer generierte rekombinante UL56- bzw. UL86-Virusmutanten.....	82
Tab. 32:	Suszeptibilität der UL56-mutierten rekombinanten Viren im Vergleich zu RV-HG gegen AIC246, AIC2, AIC3 sowie den zugelassenen Polymeraseinhibitor GCV und die Terminaseinhibitoren Bay 38-4766 und BDCRB.....	88

Tab. 33: Suszeptibilität der UL86-mutierten rekombinanten Viren im Vergleich zu RV-HG
gegen AIC246, AIC2 bzw. AIC3..... 89

Tab. 34: Suszeptibilität der UL86-mutierten rekombinanten Viren im Vergleich zu RV-HG
gegen den zugelassenen Polymeraseinhibitor GCV sowie die Terminase Inhibitoren
Bay 38-4766 und BDCRB 90

Publikationen

Ein Teil der hier vorgestellten Ergebnisse wurde bereits in Fachzeitschriften publiziert.

Originalpublikationen:

Lischka, P., G. Hewlett, T. Wunberg, J. Baumeister, D. Paulsen, T. Goldner, H. Ruebsamen-Schaeff, and H. Zimmermann. 2010. In vitro and in vivo activities of the novel anticytomegalovirus compound AIC246. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:1290-7.

Goldner, T., G. Hewlett, N. Ettischer, H. Ruebsamen-Schaeff, H. Zimmermann, and P. Lischka. 2011. The Novel Anticytomegalovirus Compound AIC246 (Letemovir) Inhibits Human Cytomegalovirus Replication through a Specific Antiviral Mechanism That Involves the Viral Terminase. *J Virol* 85:10884-93.

Ein Teil der hier vorgestellten Ergebnisse wurde bereits auf Tagungen vorgestellt.

Poster:

P. Lischka¹, G. Hewlett², T. Wunberg³, J. Baumeister⁴, D. Paulsen¹, T. Goldner¹, H. Ruebsamen-Schaeff¹, H. Zimmermann¹.

In vitro and *in vivo* activities of the novel anti cytomegalovirus compound AIC246

¹AiCuris GmbH & Co. KG, Wuppertal, Germany; ²HBSC, Wuppertal, Germany;

³Boehringer Ingelheim Austria GmbH, Vienna, Austria; ⁴Ablynx, Ghent, Belgium

4th European Congress of Virology. Como, Italy.

T. Goldner¹, G. Hewlett², H. Rübsamen-Schaeff¹, H. Zimmermann¹ and P. Lischka¹.

The novel anti cytomegalovirus compound AIC246 targets the viral terminase complex

¹AiCuris GmbH & Co. KG, Wuppertal, Germany; ²HSCB, Wuppertal, Germany

4th European Congress of Virology. Como, Italy.

T. Goldner; H. Rübsamen-Schaeff, H. Zimmermann and P. Lischka.

The novel Anti-Cytomegalovirus Compound AIC246 interferes with processing of HCMV-progeny DNA

AiCuris GmbH & Co. KG, Wuppertal, Germany.

37th Annual International Herpesvirus Workshop. Salt Lake City, USA.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Düsseldorf, Mai 2012

Thomas Georg Erich Goldner

Die Entstehung des Lebens auf der Erde mit dem Zufall erklären heißt, von der Explosion einer Druckerei das Zustandekommen eines Lexikons zu erwarten.

Edwin Conklin, Biologe