

**Aus dem Institut für Medizinische Virologie  
und Epidemiologie der Viruskrankheiten  
der Universität Tübingen  
Direktor: Professor Dr. G. Jahn**

**Vergleichende Sequenzanalyse der Tegumentproteine  
UL24, UL32, UL48 und UL128-131A  
bei humanen Cytomegalovirusvarianten  
mit unterschiedlichem Zelltropismus**

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

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

**vorgelegt von  
Susann Friedericke Autenrieth  
aus  
Nürtingen**

**2006**

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. C. Sinzger

2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. K. Klingel

Meinen Eltern

# 1 Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>7</b>
2.1	<i>Bedeutung von HCMV als Krankheitserreger.....</i>	7
2.2	<i>Struktur des HCMV .....</i>	9
2.3	<i>Replikationszyklus von HCMV.....</i>	11
2.4	<i>Pathogenese und Zelltropismus von HCMV.....</i>	13
2.5	<i>Zelluläre Transportmechanismen bei HCMV-Infektion .....</i>	17
2.6	<i>Generierung des Isolatpaares 40E/F mit unterschiedlichem Endothelzelltropismus .....</i>	19
2.7	<i>Auswahl der Kandidatengene UL24, UL32, UL48, UL128, UL130 und UL131A .....</i>	21
2.8	<i>Zielsetzung dieser Arbeit.....</i>	23
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>25</b>
3.1	<i>Materialien.....</i>	25
3.1.1	<i>Zellen.....</i>	26
3.1.2	<i>Virusstämme.....</i>	26
3.1.3	<i>Bakterienstämme.....</i>	26
3.1.4	<i>Puffer und Lösungen .....</i>	27
3.1.5	<i>Nukleinsäuren.....</i>	27
3.1.6	<i>Vektoren .....</i>	27
3.1.7	<i>Synthetisch hergestellte Oligonukleotide .....</i>	27
3.1.8	<i>Enzyme.....</i>	32
3.1.9	<i>Kits.....</i>	32
3.1.10	<i>Geräte .....</i>	32

3.2	<i>Methoden</i> .....	33
3.2.1	Zellkulturverfahren .....	33
3.2.2	Isolierung und Kultur der Zellen .....	33
3.2.3	DNA-Analyse .....	34
3.2.4	Southern-Blot-Analyse .....	39
3.2.5	DNA-Sequenzierung .....	39
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>42</b>
4.1	<i>Die Tegumentproteine UL24 und UL48 tragen nicht zu Zelltropismusunterschieden zwischen den Stämmen HCMV 40E und HCMV 40F bei</i> .....	44
4.2	<i>Im Leserahmen von UL32 zeigt sich ein Sequenzunterschied zwischen HCMV 40E und HCMV 40F</i> .....	46
4.3	<i>Der Genombereich UL128-131 weist Polymorphismen zwischen HCMV 40E und HCMV 40F auf</i> .....	50
4.4	<i>Zusammenfassende Darstellung der Sequenzvariabilität zwischen dem Laborstamm HCMV AD169 und dem Isolatpaar HCMV 40E und HCMV 40F</i> .....	57
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>61</b>
5.1	<i>Die mögliche Rolle der Tegumentproteine UL24, UL48 und UL32 für den Endothelzelltropismus von HCMV</i> .....	62
5.2	<i>Die mögliche Rolle der Genregion UL128-131A für den Endothelzelltropismus von HCMV</i> .....	67
5.3	<i>Die Eignung des HCMV-Stammpaares 40E/F als Modellsystem für die Genotypanalyse des Endothelzelltropismus von HCMV</i> .....	68
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>72</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>75</b>
7.1	<i>Übersicht</i> .....	75
7.1.1	Anhang 1 .....	76

7.1.2	Anhang 2 .....	78
7.1.3	Anhang 3 .....	79
7.1.4	Anhang 4 .....	88
7.1.5	Anhang 5 .....	91
7.1.6	Anhang 6 .....	94
<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>95</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>97</b>

## 2 Einleitung

Das menschliche Cytomegalovirus (HCMV) ist ein wichtiger Vertreter der Familie der Herpesviren. Es zeichnet sich durch seine ausgeprägte Wirtsspezifität, seinen langsamen Replikationszyklus und die Vergrößerung der infizierten Zellen (Zytomegalie) aus. Damit unterscheidet es sich von anderen Vertretern dieser Familie, zu welcher das Herpes-simplex-Virus (HSV) Typ 1 und 2, das Varizella-Zoster-Virus (VZV), das Epstein-Barr-Virus (EBV) und das humane Herpesvirus (HHV) Typ 8 zählen. Aufgrund dieser charakteristischen Eigenschaften wurde das HCMV der Unterfamilie der  $\beta$ -Herpesviren zugeordnet (Roizman, 1993).

### **2.1 Bedeutung von HCMV als Krankheitserreger**

Das HCMV ist ein weltweit verbreitetes Virus. Untersuchungen in verschiedenen Regionen und Bevölkerungsgruppen ergaben eine Durchseuchungsrate von 50 bis 100% (Alford, 1993). In Industriestaaten und Deutschland liegt sie zwischen 40 und 70% (Lamberson & Dock, 1992). Eine andere Situation zeigt sich in den Entwicklungsländern und unteren sozialen Schichten der entwickelten Länder, wo die Durchseuchungsrate deutlich höher liegt (de Jong et al., 1998; Pass, 2001).

Auffällig sind altersabhängige Unterschiede, wobei die Prävalenz nach der Kindheit stetig ansteigt (de Jong et al., 1998). Die HCMV-Infektion zeichnet sich durch eine enorme Variabilität in Symptomatik und Verlauf aus. Die Übertragung des Virus erfolgt intrauterin, auf hämatogenem Wege oder durch Körpersekrete wie Muttermilch, Speichel, Urin, Stuhl, Sperma und Sekrete des Genitalbereichs (Pass, 2001), sowie Organtransplantationen (Pass, 1985) und Bluttransfusionen.

Die intrauterine Übertragung während der Schwangerschaft kann in 10% der Fälle zu einer schweren Schädigung des ungeborenen Kindes führen (Alford, 1990; Jahn et al., 1988). Bei dieser kommt es zu einem Multiorganbefall, bei dem eine Hepatosplenomegalie, Thrombozytopenische Purpura, Ikterus und zentralnervöse Störungen wie Mikrozephalus und Gehörschäden im Vordergrund stehen (Arvin, 1997; Jahn et al., 1988; Modrow, 1997; Pass, 2001). Eine perinatale Infektion verläuft nur bei Frühgeborenen in Einzelfällen klinisch manifest.

Die Primärinfektion bei immunkompetenten Personen verläuft dagegen meist asymptomatisch und nur in wenigen Fällen kommt es zu einem mononukleose-ähnlichen Krankheitsbild und grippeähnlichen Erscheinungen (Alford, 1993).

Nach der akuten Primärinfektion persistiert das Virus, wie es für alle humanpathogenen Herpesviren charakteristisch ist, lebenslang im Körper und kann sporadisch aus der Latenzphase reaktiviert werden. Durch die Diversität der Antigene verschiedener Virusstämme kann es aber auch zu einer erneuten Infektion mit HCMV kommen (Alford, 1993).

Die Ausbreitung des HCMV ist ganz entscheidend vom Immunstatus des Infizierten abhängig. So kann eine Infektion oder auch Reaktivierung bei immunsupprimierten Patienten, wie beispielsweise Empfängern von Organ- oder Knochenmarkstransplantaten, Patienten mit einer HIV-Infektion und folgendem erworbenem Immundefizitssyndrom (AIDS) sowie Frühgeborenen, deren Immunsystem noch nicht voll ausgereift ist, schwerste Erkrankungen mit zum Teil lebensbedrohlichen Folgen hervorrufen.

Bei AIDS-Patienten zählt das HCMV neben *Pseudomonas aeruginosa* zu den häufigsten opportunistischen Erregern (Spector et al., 1984). Die Infektion mit HCMV wird sogar als ein möglicher Kofaktor bei der Entwicklung und dem Fortschreiten der erworbenen Immunschwäche diskutiert (Webster, 1991).

Die Infektion von Leukozyten (Gerna et al., 1992; Grefte et al., 1994; Grefte et al., 1992), Makrophagen (Sinzger et al., 1996a) und zirkulierender



Endothelzellen (Grefte et al., 1993) befähigen das HCMV zu hämatogenen Disseminierung, aus der generalisierte systemische Infektionen resultieren können (Sinzger & Jahn, 1996). Durch seinen breiten Zelltropismus kann das HCMV auf diesem Wege nahezu jedes Organ infizieren (Sinzger et al., 1995). In der Folge können sich eine HCMV-Hepatitis (Barkholt et al., 1994), -Retinitis (Danner, 1995), -Pneumonie (Einsele et al., 1993), -Enzephalitis (Alford, 1993) sowie gastrointestinale Erosionen und Ulzera entwickeln (Sinzger et al., 1993) folgen.

## **2.2 Struktur des HCMV**

HCMV weist die charakteristische Virionstruktur eines Herpesvirus auf. Das reife infektiöse Viruspartikel mit einem Durchmesser von 150-200nm, besteht aus drei Hauptstrukturkomponenten: dem Nukleokapsid, dem Tegument und der Hülle ("Envelope").

Das Nukleokapsid, das aus 162 Kapsomeren besteht und eine ikosaedrische Gestalt besitzt, umgibt das Protein-Core, welches die lineare, doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (DNA) enthält. Dieses Nukleokapsid ist in eine Schicht, die Tegument genannt wird, eingebettet. Es füllt den Raum zwischen Hülle und Kapsid aus und besteht aus einer amorphen Masse aus Strukturproteinen. Nach außen hin wird das Virion durch eine von zytoplasmatischen Membranen abgeleitete Hülle, einer Lipid-Doppelschicht, begrenzt (Mocarski, 2001; Roizman, 1993). Hier sind die viralen Oberflächenproteine, wie zum Beispiel die Glykoproteine gB (UL55), gH (UL75), gM (UL100) und gL (UL115) eingelagert (Britt & Mach, 1996). Diese Glykoproteine sind bei der Adsorption der Viruspartikel an die Rezeptoren der Wirtszellen, der Penetration und Aufnahme der Partikel in die Zellen, sowie der Übertragung der Infektion von Zelle zu Zelle funktionell beteiligt. Wichtige Ziele der neutralisierenden Antikörper sind unter anderem gB (UL55), gH (UL75) und der Glykoproteinkomplex II (Britt et al., 1990; Urban et al., 1996).

Das Kapsid des HCMV wird aus vier Proteinen aufgebaut, dem „major capsid protein“ (MCP, UL86) – das größte Kapsidprotein, welches 90% der

Kapsidproteinmasse ausmacht -, dem „minor capsid protein“ (mCP, UL46), dem „mCP-binding protein“ (mC-BP, UL46) sowie dem „smallest capsid protein“ (SCP, UL48/49). In Analogie zu ihren HSV-Homologen bilden sie die Kapsidhülle (Gibson, 1996).

Das sich zwischen Hülle und Kapsid befindende Tegument ist eine Proteinmatrix, die bei Infektion mit in die Zelle gelangt. Es macht annähernd 40% der Virion-Proteinmasse aus (Gibson, 1996; Irmiere & Gibson, 1983; Jahn et al., 1987a). Es besteht vorwiegend aus sechs Strukturproteinen, dem „high-molecular-weight protein“ (HMWP, UL48), dem „HMWP-binding protein“ (hmw-BP, UL47), dem „basic phosphoprotein“ (BPP oder pp150, UL32), dem „upper matrix protein“ (UM oder pp71, UL82), dem „lower matrix protein“ (LM oder pp65, UL83) und dem „24K-phosphoprotein“ (pp28) (Gibson, 1996). Das BPP (pp150, UL32), das UM (pp71, UL82) und pp28 (UL99) bleiben auch nach einer Behandlung mit Detergenzien eng mit dem Nukleokapsid verbunden (Baldick & Shenk, 1996; Gibson, 1996).

Daneben gibt es noch mehr als 20 weitere Tegumentproteine, die in HCMV identifiziert wurden (Chen et al., 1999). Zu diesen zählt das UM (pp71, UL82), dem eine mutmaßliche strukturelle Rolle im Virion zugeschrieben wird (Gibson, 1996). Zusätzlich konnte eine Funktion als ein transkriptionaler Transaktivator des major immediate-early Promotors von HCMV nachgewiesen werden (Liu & Stinski, 1992), also des Promotors der Gene, die nach Infektion zuerst exprimiert werden.

Neben ihrer starken immunogenen Wirkung (Jahn et al., 1987a) wird den Phosphoproteinen pp65 (UL83) und pp150 (UL32) eine Funktion bei der Phosphorylierung durch die virionassoziierte Proteinkinase zugeschrieben (Baldick & Shenk, 1996; Gibson, 1996). Allerdings scheint das pp65 (UL83) für die virale Replikation in Gewebekulturen entbehrlich zu sein (Schmolke et al., 1995).

Das im Inneren des Kapsids liegende 235kbp große HCMV-Genom ist das größte der 8 humanpathogenen Herpesviren (Mocarski, 2001). Es besteht aus

einer linearen doppelsträngigen DNA, die durch die Assoziation mit Proteinen dicht gefaltet vorliegt (Furlong et al., 1972). Das HCMV-Genom ist ähnlich wie das von HSV-1 aufgebaut und besteht aus zwei unterschiedlich langen, singulär vorkommenden Segmenten, der sogenannten Unique long- (UL) und der Unique short-Region (US). An den Genomenden und an der Verbindungsstelle zwischen UL und US, die als „junction region“ bezeichnet wird, befinden sich Genomregionen, die je nach Lage als „terminal repeats“ (am Genomende, TRL bzw. TRS) und „internal repeats“ (innerhalb des Genoms, IRL bzw. IRS) bezeichnet werden (Stinski, 1991). Dies bringt die Genomkonfiguration TRL-UL-IRL-IRS-US-TRS hervor (Mocarski, 2001). Eine direkt wiederholte  $\alpha$ -Sequenz findet sich am Genomende und liegt auch in inverser Orientierung an der Verbindungsstelle zwischen UL und US. Diese Anordnung der  $\alpha$ -Sequenzen fördert die Genominversion (Mocarski, 2001). Durch die Lage der Sequenzwiederholungen und ihrer Orientierung zueinander können vier verschiedene Isomere des Genoms entstehen, die mit gleicher Häufigkeit auftreten (Fleckenstein et al., 1982; La Femina, 1980).

Das Genom des Laborstammes AD169 wurde vollständig sequenziert und enthält die Information für ca. 160 potentielle offene Leserahmen (ORF) mit zum Teil noch unbekannter Funktion (Jahn & Mach, 1990). Im Vergleich zu den Laborstämmen AD169 und Towne besitzen klinische Isolate zusätzlich ein 15 kbp-Fragment, welches 22 ORF umfasst, die überwiegend für Glykoproteine kodieren. Dieser Unterschied im Genom äußert sich u.a. in der unterschiedlichen Virulenz der verschiedenen Stämme. So führt eine Infektion mit AD169 oder Towne zwar zu einer Serokonversion, aber nicht zu einer CMV-Erkrankung (Cha et al., 1996).

### **2.3 Replikationszyklus von HCMV**

Der lytische Replikationszyklus beginnt durch die Adsorption der Viren an die Zelloberfläche der Wirtszelle, die durch die Glykoproteine vermittelt wird (Compton, 1995). Nach dem Verschmelzen des Virus-Envelopes mit der Zellmembran, der Penetration, wird das Nukleokapsid zusammen mit Anteilen

des Teguments zum Zellkern transportiert (Compton, 1995; Mocarski, 2001). Beim sogenannten „uncoating“ wird anschließend die virale DNA in den Zellkern freigesetzt.

Die produktive Replikation in permissiven Zellen folgt durch die koordinierte Expression viraler Gene, die durch verschiedene Kinetikklassen- abhängig von der Zeit der Expression und der Sensitivität der Inhibition der Proteinsynthese oder viralen DNA-Synthese- bestimmt wurden. Diese Klassen wurden als  $\alpha$ - oder „immediate early“ (sehr frühe Gene, IE),  $\beta$  oder „early“ (frühe Gene, E) und  $\gamma$  oder „late“ (späte Gene, L) bezeichnet, entsprechend der drei Phasen der viralen Genexpression.

Obwohl der Replikationszyklus des HCMV langsam ist und bis zur Freisetzung von Nachkommenviren 48 bis 72 Stunden vergehen, beginnt die Expression der IE-Gene unmittelbar nach dem viralen Eintritt in die Zelle. Hierfür ist keine de novo Proteinsynthese notwendig. Diese früheste Phase der Infektion wird von viralen Tegumentproteinen beeinflusst (Mocarski, 2001). Der genaue Mechanismus ist allerdings noch nicht vollständig verstanden. Die IE-Gene kodieren für Proteine, denen sowohl regulatorische Funktionen als Transaktivatoren von frühen („early“, E) und einigen späten („late“, L), aber auch von zellulären Genen, als auch eine Mitwirkung bei der viralen DNA-Replikation zugesprochen wird. Unter IE-Bedingung zeigt die sogenannte Haupt-IE-Region (MIE; UL122/123) eine besonders starke Expression (Jahn et al., 1984).

In der darauf folgenden E („early“)-Phase werden Proteine, die für die virale DNA-Replikation benötigt werden, synthetisiert. So zum Beispiel das Protein p52 (UL44), das mit der DNA-Polymerase assoziiert ist und deren Aktivität stimuliert (Anders & McCue, 1996). Diese Proteine werden ungefähr 6-24 Stunden nach Infektion nachweisbar (Mocarski, 2001). In der letzten Phase des viralen Replikationszyklus, der L („late“)-Phase, werden schließlich die Strukturproteine der Nachkommenviren, wie zum Beispiel das Tegumentprotein pp150 (UL32) oder das Hauptkapsidprotein (MCP; UL86), exprimiert (Chee et al., 1989; Jahn et al., 1987b).

Der Wechsel von der frühen auf die späte Phase erfolgt in Fibroblasten nach 24 bis 36 Stunden (Mocarski, 2001). Der Zusammenbau der Kapside („assembly“) und die Verpackung der DNA erfolgen im Zellkern der Wirtszelle. Die DNA-Beladung im Zellkern und die Tegumentalisation der Kapside im Kern bzw. an der Kernmembran scheinen wie in HSV-infizierten Zellen zu verlaufen (Gibson, 1996) und finden im Zytoplasma statt. Nach dem Durchtritt durch die Kernmembran liegen nackte Partikel vor, die im Zytoplasma dann weiter tegumentalisiert und von Vesikeln umschlossen werden. So entsteht eine zweifache Membran, wobei der äußere Anteil bei Verlassen der Zelle zurückgelassen wird, der innere hingegen die Hülle der Nachkommenviren bildet (Gibson, 1996). Der Replikationszyklus von HCMV verläuft produktiv mit Freisetzung der Viruspartikel, wobei die infizierte Zelle zerstört wird (Mocarski, 2001).

#### ***2.4 Pathogenese und Zelltropismus von HCMV***

Um die Pathogenese des HCMV verstehen zu können, ist es notwendig die Übertragungswege infektiöser HCMV-Partikel und die Zielzellen, in denen es repliziert, zu identifizieren. Weitere wichtige Faktoren der Pathogenese sind die biologischen Mechanismen, die den Zelltropismus von HCMV beeinflussen, die Ausbreitung des Virus sowie die Strategien, die das Virus im Laufe der Evolution entwickelt hat, um dem menschlichen Immunsystem zu entrinnen, und so eine lebenslange Persistenz im Wirtsorganismus zu erreichen.

Die Definition der Virulenzfaktoren ist entscheidend, um die unterschiedlichen klinischen Verläufe erklären und Therapieansätze sowie Impfstrategien entwickeln zu können. Ein wichtiger Faktor ist dabei das breite Zielzellspektrum von HCMV *in vivo*. Dieses ermöglicht dem Virus die hämatogene Disseminierung, und somit die Ausbreitung im Organismus und die Infektion zahlreicher Organe. HCMV infiziert in erster Linie Fibroblasten, Epithelzellen und Endothelzellen, die im Organismus sehr häufig und ubiquitär verbreitet vorkommen (Sinzger et al., 1995). Es werden aber auch Makrophagen, polymorphkernige und mononukleäre Leukozyten im peripheren Blut infiziert

(Gerna et al., 1992; Greffe et al., 1994; Greffe et al., 1992). Makrophagen wurden in akut infizierten Organen (Plazenta, Lunge und Gastrointestinaltrakt) als Zielzellen identifiziert (Sinzger & Jahn, 1996). Zusätzlich sind auch spezialisierte Parenchymzellen, wie Trophoblasten der Plazenta (Halwachs-Baumann et al., 1998), Hepatozyten, glatte Muskelzellen im Gastrointestinaltrakt sowie Neurone im Gehirn und der Retina Zielzellen von HCMV (Horn et al., 1992; Plachter et al., 1996; Rummelt et al., 1994; Sano & Izumi, 1991; Schmidbauer et al., 1989; Schmolke et al., 1995; Sinzger et al., 1999; Sinzger et al., 1993; Wiley & Nelson, 1988).

Infizierte Endothelzellen konnten in vielen Organen, wie zum Beispiel Gehirn (Wiley & Nelson, 1988), Herz (Arbustini et al., 1992), Lunge, Gastrointestinaltrakt und Plazenta (Sinzger et al., 1995; Sinzger et al., 1993) nachgewiesen werden. Es wurde gezeigt, dass spät infizierte Zellen endothelialen Ursprungs im peripheren Blut akut infizierter Patienten zirkulieren. Diese Endothelzellen sind sehr wahrscheinlich für die hämatogene Ausbreitung des Virus mitverantwortlich (Greffe et al., 1994; Greffe et al., 1992; Percivalle et al., 1993; Sinzger et al., 1995), da sie sich während der späten Phase des viralen Replikationszyklus von der Basalmembran der Gefäßwand ablösen und so in die Blutzirkulation gelangen (Greffe et al., 1995). Es wird angenommen, dass diese infizierten Endothelzellen aufgrund ihrer Größe in den feinen Gewebekapillaren der Organe hängen bleiben und so eine Organinfektion auslösen können, da sie an dieser Stelle das HCMV-Virus an die Kapillarendothelzellen übertragen (Sinzger & Jahn, 1996). Es hat sich bestätigt, dass Endothelzellen kleiner Gefäße Hauptzielzellen von HCMV sind (Sinzger et al., 1995). Außerdem wurden spät infizierte Riesenzellen mit nukleären Einschlüssen gefunden, die das Lumen von Kapillaren verschlossen (Sinzger et al., 1995). Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen konnten hier HCMV-Partikel nachgewiesen werden, was die produktive Infektion dieser Zellen bestätigt (Greffe et al., 1993).

Im Weiteren besteht zwischen den zirkulierenden HCMV-infizierten Zellen und der Entstehung von symptomatischen Organmanifestationen bei Patienten nach

Transplantation eine gewisse Korrelation (Grefte et al., 1993; Percivalle et al., 1993). In Analogie zu dem breiten Zelltropismus von HCMV in vivo existieren zahlreiche Zellkultursysteme, die für eine HCMV-Infektion in vitro permissiv sind. Da HCMV streng wirtsspezifisch ist und keine geeigneten Tiermodelle für HCMV existieren, ist man für die Untersuchung der Pathogenese von HCMV auf Zellkulturmodelle angewiesen. Als Standardzellkultursystem werden üblicherweise Fibroblasten verwendet. Des Weiteren wurden Infektionen von Endothelzellen unterschiedlicher Herkunft, Epithelzellen, neuronale Zellen, glatte Muskelzellen, Trophoblasten, Makrophagen und antigenpräsentierende Zellen (APC), wie zum Beispiel dendritische Zellen, in vitro beschrieben (Halwachs-Baumann et al., 1998; Heieren et al., 1988; Ibanez et al., 1991; Kahl et al., 2000; Pulliam et al., 1988; Riegler et al., 2000; Tumilowicz, 1990; Waldman et al., 1991).

Bereits in den frühen 80er Jahren wurde entdeckt, dass es Virulenzunterschiede zwischen verschiedenen HCMV-Stämmen gibt (Quinnan et al., 1984). Laborstämme, die lange auf Fibroblasten propagiert wurden, sind im Gegensatz zu niedrig passagierten Isolaten nicht mehr humanpathogen (Quinnan et al., 1984). Auch im Hinblick auf den Zelltropismus wurden Unterschiede zwischen niedrig passagierten Isolaten und Laborstämmen nachgewiesen. Im Rahmen von Impfstudien mit attenuierten Stämmen war aufgefallen, dass die meisten klinischen Isolate sowohl einen ausgeprägten Tropismus als auch Zytopathogenität für Endothelzellen aufweisen. Laborstämme hingegen, die lange Zeit auf Fibroblasten propagiert wurden, besitzen diese Eigenschaft nicht mehr (Sinzger et al., 1997; Waldman et al., 1989; Webster, 1991). Klinische endotheliotrope Stämme scheinen also durch Passagierung auf Fibroblasten über längere Zeit ihre Zytopathogenität für Endothelzellen zu verlieren. Werden klinische Isolate hingegen auf Endothelzellen propagiert so bleibt der Endothelzelltropismus erhalten. Damit übereinstimmend wurde in SCID-Mäusen mit humanen Leber- und Thymustransplantaten festgestellt, dass der niedrig passagierte HCMV-Stamm Toledo in hohen Titern innerhalb von 14 Tagen nach Inokulation replizierte, wohingegen die Fibroblasten-adaptierten Laborstämme Towne und AD169 mit

100- bis 1000-fach reduzierter Effizienz replizierten (Brown et al., 1995). Die Autoren nahmen an, dass diese Stammunterschiede in der Replikation durch Unterschiede im Zelltropismus verursacht sind. Dies könnte von klinischer Bedeutung sein, da es wahrscheinlich ist, dass die Fähigkeit von HCMV-Stämmen Endothelzellen zu infizieren, den klinischen Verlauf einer HCMV-Infektion beeinflusst (Grefte et al., 1995). Außerdem sind wie oben beschrieben vaskuläre Endothelzellen Zielzellen von HCMV (Roberts et al., 1989; Sinzger et al., 1995; Sinzger & Jahn, 1996; Sinzger et al., 1993) und spielen eine wichtige Rolle bei der hämatogenen Disseminierung des Virus (Sinzger et al., 1999). Daher wird der Phänotyp Endothelzelltropismus als ein entscheidender Virulenzfaktor diskutiert (Percivalle et al., 1993; Sinzger et al., 1999).

Arbeiten von Cha et al. zeigten, dass bei den apathogenen Laborstämmen AD169 und Towne in den Genomen Sequenzen von einigen Kilobasen fehlen, die in allen klinischen Isolaten vorkommen (Cha et al., 1996). Dies führt zu der Hypothese, dass sich die klinischen HCMV-Isolate sowohl untereinander als auch im Vergleich zu den Laborstämmen in ihrem Zelltropismus und ihrer Virulenz unterscheiden, und dass diese Phänotyp-Variation vielleicht in genomischen Unterschieden begründet liegt (Sinzger et al., 1997). Auch verloren endotheliotrope klinische Isolate bei Langzeitadaptation in Fibroblastenkulturen ihren Endotheltropismus, wohingegen dieselben Isolate bei Langzeitadaptation in Endothelzellen den Fibroblasten- und Endothelzelltropismus beibehielten. Auffällig waren dabei Genomunterschiede der unterschiedlich adaptierten Stämme, was zu der Folgerung führte, dass der Endothelzelltropismus eine angeborene Eigenschaft ist, die genetisch determiniert wird (Sinzger et al., 1999).

Unklar ist dabei aber noch die Bedeutung einzelner Gene für die Unterschiede im Zelltropismus. So wurde bei Mäuse-CMV (MCMV) ein Ribonukleotid-Reduktase-Homolog (kodiert durch M45 ORF) identifiziert, das für das Viruswachstum in Endothelzellen unentbehrlich ist (Brune et al., 2001). Allerdings zeigte sich in Arbeiten von Hahn et al., dass das HCMV-Ribonukleotid-Reduktase-Homolog UL45 nicht mit dem Endothelzelltropismus



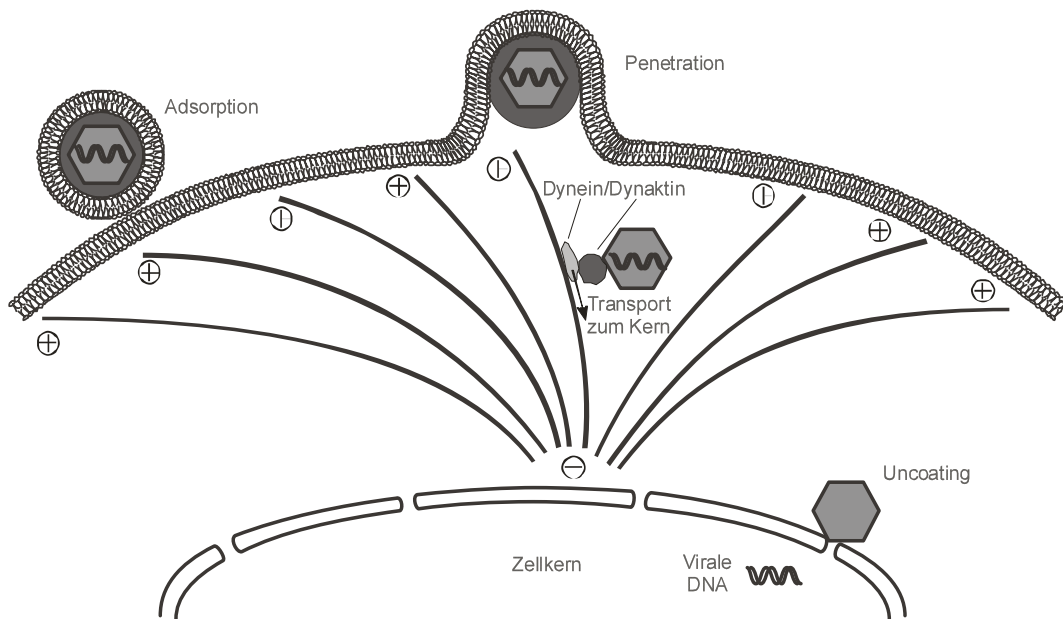
assoziiert ist und damit für das Wachstum in Endothelzellen entbehrlich ist (Hahn et al., 2004).

## **2.5 Zelluläre Transportmechanismen bei HCMV-Infektion**

Slobbe-van Drunen et al. zeigten Ende der 90er Jahre, dass die begrenzte Permissivität des Laborstamms AD169 in Endothelzellen, im Gegensatz zu Fibroblasten, nicht durch einen limitierten Eintritt des Virus in die Zelle begründet ist, sondern die virale DNA nicht effizient zum Zellkern der Endothelzellen transportiert wird (Slobbe-van Drunen et al., 1998). Schließlich wurde nachgewiesen, dass auch bei anderen nichtendotheliotropen Stämmen zwar eine erfolgreiche Adaptation und Penetration von HCMV erfolgt, die virale DNA aber ineffektiv von der Peripherie zum Zellkern transportiert wird (Sinzger et al., 2000). Die Fähigkeit der nichtendotheliotropen HCMV-Varianten zur Freisetzung ihrer DNA in Endothelzellen war um den Faktor 100 bis 1000 reduziert, wohingegen alle endotheliotropen Stämme auch in Endothelzellen zu einem effizienten Uncoating befähigt waren. Dabei korreliert die Effizienz der Translokation viraler DNA mit dem Endothelzelltropismus von HCMV-Varianten (Sinzger et al., 2000).

Da Viren selbst keine Bewegung erzeugen können, sind sie in der Zelle auf zelluläre Transportmechanismen angewiesen, um zum Zellkern zu gelangen. Daher ist die Interaktion der Viren mit den zellulären Transportmechanismen ein wichtiger Faktor für die Ausprägung des Zelltropismus von HCMV. Alle Vorgänge des intrazellulären Transports werden durch Bestandteile des Zytoskeletts, dem Mikrotubulussystem, vermittelt. Dabei lassen sich drei verschiedene Arten des zellulären Transports unterscheiden: (1) Aktin und Myosin sind für lokale Transportvorgänge verantwortlich, (2) das Kinesin dient als Transporter in Richtung Peripherie, dem Plus-Ende des Mikrotubulus und (3) das Dynein transportiert von der Peripherie bzw. dem Plus-Ende in Richtung Zellkern bzw. dem Minus-Ende des Mikrotubulus. (Alberts, 1994; Hirokawa, 1998a; Hirokawa et al., 1998).

Dass Dynein an der Vermittlung von viralen Infektionen beteiligt ist, wurde u.a. von Sodeik 1997 beobachtet. Diese Arbeit untersuchte, wie das HSV Typ 1 in kultivierten Zellen transportiert wird. Dabei wurde gezeigt, dass der Transport der viralen Kapside zum Zellkern von einem intakten Mikrotubulussystem abhängt, und dass das zytoplasmatische Dynein eng an die viralen Kapside gebunden ist (Sodeik et al., 1997).



**Abb. 2:** Modell des Transports von HCMV zum Zellkern mittels Dynein- Dynaktin-Komplexe

Der Dyneinkomplex, der wahrscheinlich für den Transport des HCMV-Partikels zum Zellkern verantwortlich ist, besteht aus mehreren Untereinheiten und ist wiederum eng mit dem Proteinkomplex Dynaktin verbunden (Hirokawa, 1998a; Hirokawa et al., 1998; Karki & Holzbaur, 1999). Dynein bildet dabei die Bindungsstelle an das Mikrotubulussystem, fungiert als Motor und ist an zahlreichen Ereignissen in der Zelle wie anterograden Transport der Zellorganellen, Mitose und nukleärer Migration beteiligt (Hirokawa, 1998a; Hirokawa et al., 1998; Nurminsky et al., 1998).

Dynaktin besteht ebenfalls aus mehreren Untereinheiten, ist ein Aktivator des Dynein *in vitro* (Gill et al., 1991) und wird für die Funktion des Dyneins *in vivo* benötigt (McGrail et al., 1995; Muhua et al., 1994; Nurminsky et al., 1998). Es

dient wahrscheinlich als eine Bindungsplattform des Dyneins und vermittelt so die Assoziation von Dynein an seine Ladung (Karki & Holzbaur, 1999).

Die Interaktion zwischen den Viruspartikeln und dem Dyneinkomplex der Zelle wird durch entsprechende Proteine auf beiden Seiten vermittelt. Diese könnten im Prinzip zu den beschriebenen Zelltropismusunterschieden beitragen (Abb. 2). Auf viraler Seite sind dies in erster Linie die Strukturproteine, die die Unterschiede im Partikel determinieren. In diesem Falle sollten Sequenzunterschiede dieser Proteine zwischen den verschiedenen Virusvarianten nachweisbar sein.

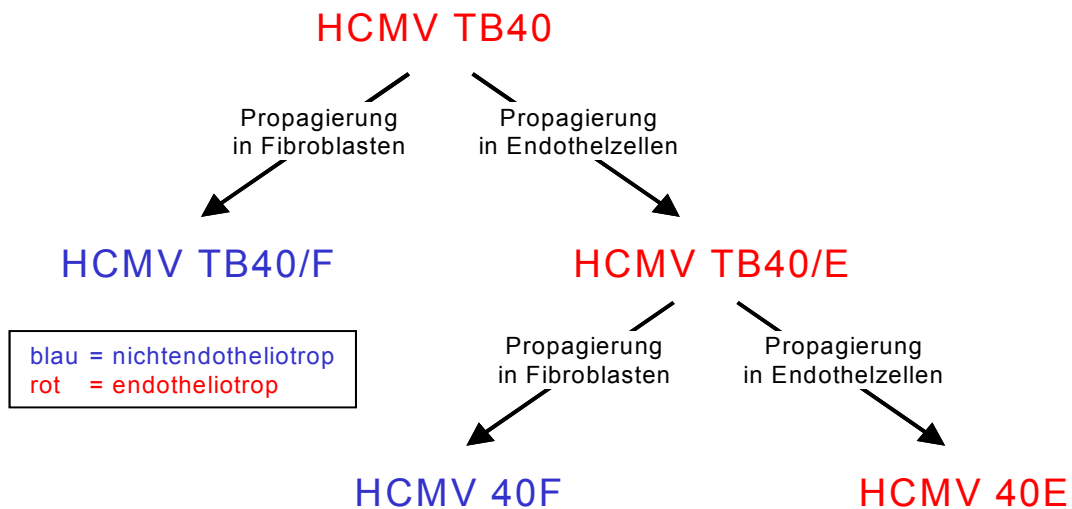
## ***2.6 Generierung des Isolatpaares 40E/F mit unterschiedlichem Endothelzelltropismus***

Da zwei beliebige HCMV-Stämme aufgrund ihres großen Genoms von ca. 235kbp einen ausgeprägten genetischen Polymorphismus aufweisen, der sich in einer zahlreichen Menge an Genomunterschieden in unterschiedlichen Bereichen des Genoms zeigt, ist ein direkter Rückschluss von Genomunterschieden auf einen bestimmten Phänotyp bei zwei beliebigen HCMV-Stämmen nicht möglich. Selbst HCMV-Stämme, die sich in ihrem Phänotyp sehr ähnlich sind, zeigen in ihrem Restriktionsmuster noch zahlreiche Unterschiede.

Bei der Auswahl der zu untersuchenden Stämme kam es daher darauf an, diese möglichst so auszuwählen, dass sie einen möglichst geringen genetischen Polymorphismus aufweisen, und dass sie sich in ihrem Phänotyp Endothelzelltropismus unterscheiden. Treffen diese beiden Eigenschaften zu, so ist es naheliegend, dass die Unterschiede, die im Restriktionsmuster auftreten, für den Zelltropismus von Bedeutung sind.

Aus diesem Grund wurde für unsere Untersuchungen ein Isolatpaar ausgewählt, bei dem diese Voraussetzungen gegeben waren. Dieses war ausgehend von einem gemeinsamen Ursprungsisolat, genannt TB40, eines infizierten Patienten entstanden.

**Abb. 3:** Schematische Darstellung der Generierung des Isoatpaares HCMV 40E und HCMV 40F aus dem Ursprungsisolat TB40.



Dieses Patientenisolat wurde parallel an Humanen Hautfibroblasten (HFF) und Humanen Endothelzellen der Umbilikalvene (HUVEC) adaptiert und dazu über 22 Passagen in HUVEC und HFF passagiert. Nach der 22. Passage erfolgte eine Plaquereinigung im jeweiligen Zelltyp und das generierte Isoatpaar wurde mit TB40/E (endothelzelladaptiert) und TB40/F (fibroblastenadaptiert) bezeichnet.

Die vergleichende Restriktionsfragment-Längenanalyse (RFLA) zeigte bei dem so entstandenen Paar multiple Genomunterschiede, die über das gesamte Genom verteilt lagen. Ein Genomvergleich im Hinblick auf den Endothelzelltropismus an dieser Stelle hätte also keinen Sinn gemacht, da es bei so vielen Unterschieden nahezu unmöglich gewesen wäre, den entscheidenden bestimmen zu können.

Aus diesem Grund wurden genetisch enger verwandte Stämme generiert. TB40/E wurde wieder zurück auf HFF adaptiert, um so eine nichtendotheliotrope Variante von TB40/E zu erhalten, die durch einzelne Mutationen während der Rückadaptation entstehen würde. Nach einem Jahr zeigte sich ein Fokusexpansionswert auf HUVEC von 0 Herden. Es zeigte sich

aber auch, dass bei sehr hoher Viruskonzentration eine Minderheitenpopulation mit Endothelzelltropismus verblieb. Dieser neue Stamm, genannt TB40E/F wurde anschließend für wenige Passagen auf HUVEC passagiert, wobei sich dann im Fokusexpansionsassay auf HUVEC 70 Herde zeigten, was zur Bezeichnung TB40E/F/E führte. Durch dreifache Plaquereinigung wurden aus TB40E/F/E einzelne Klone gewonnen, von denen ein Teil endotheliotrop und ein Teil nichtendotheliotrop war. Die so entstandenen Stämme TB40E (endotheliotrop) und TB40F (nichtendotheliotrop) zeigten eine sehr enge genetische Korrelation mit nur einem einzigen Fragmentunterschied in der RFLA. Dieses Isolatpaar weist also einen gemeinsamen genetischen Hintergrund mit geringem genetischem Polymorphismus auf und zeigt den geforderten unterschiedlichen Phänotyp.

## ***2.7 Auswahl der Kandidatengene UL24, UL32, UL48, UL128, UL130 und UL131A***

Wie bereits zuvor erwähnt, werden die Unterschiede im Endothelzelltropismus durch die unterschiedliche Effizienz, mit der penetrierte Partikel zum Zellkern transportiert werden, determiniert (Sinzger et al., 2000). Im Prinzip können alle viralen Proteine, die am Transport zum Zellkern beteiligt sind, durch entsprechende Interaktion mit zellulären Proteinen zum Endothelzelltropismus beitragen.

Im Besonderen kommen hierfür die Kapsidproteine und die kapsidassoziierten Tegumentproteine in Frage. Chen et al. zeigten in einer dreidimensionalen Darstellung des Kapsidproteins, dass dieses weitgehend von Tegument bedeckt bzw. maskiert wird (Chen et al., 1999). Auch war eine Anfärbung des „major capsid protein“ (MCP) durch Antikörper bei einer Infektion erst in der Late-Phase möglich, was nahe legt, dass dieses vorher durch Tegument maskiert wurde (Sinzger et al., 2000). Daher ist anzunehmen, dass bei HCMV das Tegument die Bindungsstelle an das zelluläre Transportsystem, den Dyneinkomplex, darstellt.

Das "high-molecular-weight protein" (HMWP, UL48) bildet das Homolog zum Tegumentprotein UL36 bei HSV Typ 1. UL36 determiniert einen ähnlichen Phänotyp bei einer temperatursensitiven (ts) Mutante von HSV Typ 1. Versuche von Roizman et al. zeigten, dass die ts-Mutante bei entsprechender Temperatur die Zelle infizieren kann, in die Zelle penetriert und das Kapsid zum Zellkern transportiert wird. Da die virale DNA aber nicht aus dem Kapsid freigesetzt werden kann, kommt es nicht zu einer produktiven Infektion (Roizman, 1993). Entscheidend ist, dass das UL36 bei HSV Typ1, und damit sein Homolog UL48 bei HCMV, ein wahrscheinlicher viraler Bindungspartner an zelluläre Transportstrukturen ist.

Das Tegumentprotein „basic phosphoprotein“ (BPP oder pp150, UL32) wurde von Gibson et al. als eines der drei Hauptkandidaten benannt, die in ausreichend hoher Quantität vorhanden sind (Baldick & Shenk, 1996; Gibson, 1996). Es ist, im Gegensatz zu den anderen beiden Kandidaten, am engsten mit dem Kapsid assoziiert und weist somit eine sehr hohe Bindungskraft zum Kapsid auf (Baxter & Gibson, 2001; Gibson, 1996; Landini & Jahn, 2000). BPP blieb auch noch nachweisbar, als alle anderen Tegumentproteine durch Behandlung mit Detergenzien bereits abgelöst waren (Gibson, 1996). Da es sich um ein eng mit dem Kapsid assoziiertes Tegumentprotein handelt ist es mit hoher Wahrscheinlichkeit einer der viralen Bindungspartner für zelluläre Transportstrukturen. Tragen diese ausgesuchten Tegumentproteine zum beschriebenen Endothelzelltropismus bei, so sollten in diesem Falle Unterschiede in der Sequenz zwischen den Virusvarianten nachweisbar sein.

Neben diesen Überlegungen zum Mechanismus des Endothelzelltropismus gab es in den vergangenen Jahren auch genetische Hinweise auf virale Proteine, die möglicherweise den Endothelzelltropismus von HCMV-Varianten determinieren. Die systematische Analyse entsprechender Deletionsmutanten hatte gezeigt, dass bei einem Wegfall der von UL24, UL128, UL130 und UL131A kodierten Proteine die Virusvermehrung in Endothelzellen reduziert ist (Dunn et al., 2003; Hahn et al., 2004). Ob eines dieser Gene jedoch auch für

die Zelltropismusunterschiede natürlich auftretender HCMV-Varianten bedeutsam ist, ist derzeit noch unklar.

## **2.8 Zielsetzung dieser Arbeit**

HCMV-Stämme zeigen Unterschiede im Zelltropismus, welcher eine angeborene Eigenschaft ist, die genetisch determiniert wird. Es wurde gezeigt, dass Veränderungen im Zelltropismus von HCMV-Stämmen mit Veränderungen der DNA assoziiert sind. Dabei ist entscheidend, dass die gesamte Information für die Expression des Phänotyps allein in der DNA enthalten ist (Sinzger et al., 1999). Bisher wurden die dafür verantwortlichen Gene jedoch noch nicht identifiziert. Somit ist unklar, welche einzelnen Veränderungen in der Aminosäuresequenz letztlich zu Veränderungen im Zelltropismus führen. Zellbiologische Arbeiten zum Zelltropismus von HCMV haben jedoch zu einer begrenzten Auswahl von viralen Genen geführt, die für diese Eigenschaft von HCMV-Stämmen entscheidend sein könnten. Dabei zeigte sich auch, dass für Unterschiede im Zelltropismus entscheidend ist, mit welcher Effizienz die Viruspartikel von HCMV-Stämmen nach der Penetration zum Zellkern transportiert werden (Sinzger et al., 2000). Der Phänotyp wird also durch Strukturproteine vermittelt. Hier spielen die Kapsidproteine und die kapsidassoziierten Tegumentproteine eine entscheidende Rolle (Chen et al., 1999; Sinzger et al., 2000).

In dieser Arbeit sollten ausgewählte Gene von HCMV-Stämmen mit unterschiedlichem Zelltropismus durch Sequenzierung verglichen werden, um so Informationen über ihre mögliche Bedeutung für den Zelltropismus von HCMV zu erhalten. Erweist sich das jeweils untersuchte Gen in den beiden HCMV-Stämmen mit unterschiedlichem Zelltropismus als identisch, wäre damit nahezu ausgeschlossen, dass es einen Einfluss auf die Zelltropismusunterschiede der HCMV-Stämme hat. Zeigt sich hingegen ein oder sogar mehrere Unterschiede auf Aminosäureebene, so kommt das entsprechende Protein als Ursache für den unterschiedlichen Zelltropismus in

Frage. Je größer die Übereinstimmung der anderen Gene ist, desto mehr fallen solche Unterschiede ins Gewicht.

So war eine wesentliche Aufgabe in dieser Arbeit geeignete Stämme für den Sequenzvergleich auszuwählen. Es ist bekannt, dass ein direkter Sequenzvergleich zweier beliebiger HCMV-Stämme eine Vielzahl von Unterschieden in nahezu jedem untersuchten Gen aufweist, ohne dass diese für den Phänotyp bedeutsam wären (Cha et al., 1996). Daher wurde für diese Arbeit ein HCMV-Isolatpaar gewählt, das nach Gewinnung aus einem Patientenisolat durch selektive Propagierung auf Endothelzellen bzw. Fibroblasten entstanden war. Aufgrund des gemeinsamen genetischen Hintergrundes lässt sich für Gene, die für den Phänotyp Zelltropismus nicht relevant sind, mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Übereinstimmung in der Sequenz erwarten.

In dieser Arbeit wurden die Tegumentproteine UL24, UL32 und UL48 sowie die Leserahmen UL128-131A untersucht, deren Lokalisation im Virion derzeit noch unbekannt ist. Für die Sequenzierung dieser Gene wurden Primerpaare (forward und reverse) im Abstand von ungefähr 400 Basenpaaren ausgesucht. Die entsprechenden Genabschnitte wurden zunächst mit Hilfe der Primerpaare und der PCR amplifiziert. Anschließend wurde das Amplifikat zur Kontrolle von Sequenzierungsfehlern in beide Richtungen sequenziert. Beim Auftreten von Unterschieden in der Genomsequenz wurden die entsprechenden Genomabschnitte, zum Ausschluss eines Synthesefehlers, durch die Taq-Polymerase bei der Amplifikation erneut amplifiziert und sequenziert. Durch Translation wurde als nächster Schritt die resultierende Aminosäuresequenz ermittelt. Unter diesen Bedingungen war zu erwarten, dass eine Identifizierung und Charakterisierung von Unterschieden in der Basenfolge in den zu untersuchenden Genomabschnitten des Isolatpaares möglich ist, sofern diese vorhanden sind. Sollte sich in einem oder mehreren der untersuchten Gene eine Sequenzidentität zeigen, so wären diese Genomabschnitte mit hoher Wahrscheinlichkeit als Ursache für die Unterschiede im Zelltropismus auszuschließen.



## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Materialien**

Bromphenolblau Sigma, Taufkirch

Calciumchlorid Merck Eurolab GmbH, Darmstadt

Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1) Sigma, Taufkirch

$\alpha$ -Chymotrypsin Sigma, Taufkirch

D-Glukose Sigma, Taufkirch

Dinatriumhydrogenphosphat Fluka, Seelze

Ethanol Merck Eurolab GmbH, Darmstadt

Ficoll HCMV 400 Sigma, Taufkirch

Fötales Kälberserum Gibco, Karlsruhe

Gentamycin Fluka, Seelze

HPLC-H<sub>2</sub>O Merck Eurolab GmbH, Darmstadt

Isopropanol Sigma, Taufkirch

Kaliumchlorid Merck Eurolab GmbH, Darmstadt

Kaliumdihydrogenphosphat Merck Eurolab GmbH, Darmstadt

Magnesiumchlorid Merck Eurolab GmbH, Darmstadt

Minimal essential medium (MEM) Gibco, Karlsruhe

Natriumacetat Sigma, Taufkirch

Natriumdodecylsulfat (SDS) Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg

Natrium-EDTA Sigma, Taufkirch

Natriumhydrogencarbonat Fluka, Seelze

Phenol Roth, Karlsruhe

Tris HCL Sigma, Taufkirch

Trypsin Gibco, Karlsruhe

100bp-Marker Peqlab, Erlangen

Dextranblau Merck Eurolab GmbH, Darmstadt

dNTP-Mix Peqlab, Erlangen

EDTA Sigma, Taufkirch

Taq DNA Polymerase Boehringer, Mannheim

### **3.1.1 Zellen**

HFF: Humane Vorhautfibroblasten (siehe 2.2.2 )

HUVEC: Humane Endothelzellen der Nabelschnurvene (siehe 2.2.2)

### **3.1.2 Virusstämme**

HCMV AD 169: HCMV-Laborstamm, der ursprünglich von Rowe isoliert wurde (Rowe et al. 1956).

TB40/E und TB40/F: HCMV-Isolatpaar, das in Endothelzellen und Fibroblasten adaptiert wurde. Das Ausgangsisolat TB40 stammte aus Rachenspülwasser eines knochenmarktransplantierten HCMV-infizierten Patienten.

40F und 40E HCMV-Isolatpaar, das in Endothelzellen und Fibroblasten adaptiert wurde und aus dem Patientenisolat TB40 entstand.

### **3.1.3 Bakterienstämme**

E.coli

### 3.1.4 Puffer und Lösungen

10x Bromphenolblau-Auftragspuffer für Agarosegele: 20% Ficoll HCMV 400, 0,1 M NaEDTA pH 8,1% SDS, 0,25% Bromphenolblau

PBS 137mmol/l NaCl, 2,7mmol/l KCL, 7,3mmol/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,9mmol/l CaCl<sub>2</sub>, 0,5mmol/l MgCl<sub>2</sub>

Taq Polymerase Puffer mit MgCl<sub>2</sub> Boehringer, Mannheim

TSR-Puffer Applied Biosystems, Weiterstadt

Lösung A 137mmol/l NaCl, 5,4mmol/l KCL, 4,2mmol/l NaHCO<sub>3</sub>, 5mmol/l D-Glukose in 500 ml H<sub>2</sub>O, pH 7,3

Lysispuffer Lysispufferstock: 10mM Tris-HCl pH 7,5, 100mM NaCl, 10mM EDTA pH 8,0, Lysispuffer frisch ansetzen: Lysispufferstock, 0,6% SDS, 100mg/l Protease K

### 3.1.5 Nukleinsäuren

DNA-Größenstandard Raoul-Marker

### 3.1.6 Vektoren

pZErO™ 1.1 „highcopy“ Vektor, Zeocinresistent invitrogen Groningen, Niederlande

### 3.1.7 Synthetisch hergestellte Oligonukleotide

Alle Primer haben eine Länge von ca. 400 Basenpaaren (bp), einen Guanin-Cytosin-Gehalt von 50-60% und wurden mit Hilfe des Computerprogramms DNAsis ausgewählt. Dabei sind die Primer mit ungerader Zahl „forward-primer“ (fw) in Leserichtung des untersuchten Genomabschnitts, die mit gerader Zahl die „reverse-primer (re).

Primer für UL 32 Roth, Karlsruhe

UL32P1 fw: 5' gac atg caa ttg ccc gcg gac aac t 3'

UL32P2 re: 5' tac ttt ggg cgg caa ggc ggt ggt a 3'

UL32P3 fw: 5' ggt aaa cgg tgg tta ccg cgg gat a 3'

UL32P4 re: 5' gcc ggt tca ggg aag gct aga gaa a 3'

UL32P5 fw: 5' cgc gcc aga agt cac gtt cct tga t 3'

UL32P6 re: 5' cgg tga cac aaa cag cgt ctc ggg a 3'

UL32P7 fw: 5' tcg tcg tct tcc tcc tcg ctg tct t 3'

UL32P8 re: 5' cac cac cgc gta caa gtt cga gca a 3'

UL32P9 fw: 5' ggt ttg ggt acc cgc gaa ggt agg t 3'

UL32P10 re: 5' cta gtg gtg gcg gtg ttt cca gca t 3'

UL32P11 fw: 5' gaa agc cgc gtg acg ctgttg ttg t 3'

UL32P12 re: 5' gtt ccg ctt cga ggc cca tgg ttc t 3'

UL32P13 fw: 5' cgc ctc gtc tcg gta tcc gtg atg t 3'

UL32P14 re: 5' cct gca gca acg tca gca gca acc a 3'

UL32P15 fw: 5' cat cgt cgt cgt cct cat cgg cac t 3'

UL32P16 re: 5' tcc cac agt cgg cg caca cgt ttt t 3'

UL32P17 fw: 5' gcg gct gcg tgg gga cat gtt tct t 3'

UL32P18 re: 5' acc tgg agg gtg tgc gcc gta aca t 3'

UL32P19 fw: 5' cgg ccc gtg tac acg agc ttg ttg a 3'

UL32P20 re: 5' cgg tgc tgt tca acg agc tca tgc t 3'

UL32P21 fw: 5' cca cga tca ccg aac ggg taa gtg t 3'

UL32P22 re: 5' ccg cgt atc cgcc ctc cgc tat taa a 3'

## Primer für UL 48 Roth, Karlsruhe

UL 48P1 fw:	5' cgg gca tct tcg act ttc tgc ggt a 3'
UL 48P2 re:	5' tcc ttg cgg cgt ttc tcg ggt gtt t 3'
UL 48P3 fw:	5' agc att ccc gtc tac gat ccc tcg t 3'
UL 48P4 re:	5' cgg tga gga aag ctt cgt cga agg a 3'
UL 48P5 fw:	5' agg agt tga agg ctc tga cgc tgc c 3'
UL 48P6 re:	5' ggg cat cgg tcg ctt ggt tac gaa a 3'
UL 48P7 fw:	5' tca tcg cct ggg tgg agg aga tgc t 3'
UL 48P8 re:	5' cag ttt cag gtc gcg cag gtc gta a 3'
UL 48P9 fw:	5' gac gcg cgt gca caa tca cat cct t 3'
UL 48P10 re:	5' cgt cgc gac gta aca tct cgc gta a 3'
UL 48P11 fw:	5' ccg cct cta cga aga gga aga gga a 3'
UL 48P12 re:	5' cgc tcg tag agt tcc gtt acc tga g 3'
UL 48P13 fw:	5' cca cgt acg cg caga tgg tca aga a 3'
UL 48P14 re:	5' aac ggc gtc cac cac gcg ttg caa a 3'
UL 48P15 fw:	5' ggc acc gag cca tcg tgt cat gca t 3'
UL 48P16 re:	5' gcc tgc tgc gtc tca tgg atc aga a 3'
UL 48P17 fw:	5' aga cgg gcg aat caa cga gtg tct g 3'
UL 48P18 re:	5' cag cgt ttt gaa aac ggg ctg ctg g 3'
UL 48P19 fw:	5' cga ctt tgc acg cta ccg cag cag t 3'
UL 48P20 re:	5' tcc gcg gtg att tgc gca agg gct t 3'

UL 48P21 fw: 5' gct gtt ggg caa agc cac gca aca a 3'

UL 48P22 re: 5' cag ccc gta gct gaa ggt ctg gat t 3'

UL 48P23 fw: 5' ccg cgc gtc atc aaa aag tgc agg a 3'

UL 48P24 re: 5' gtg tcg tgg tga cgc gcg aag cat a 3'

UL 48P25 fw: 5' gac acg tcc agc tgg gtc acc agt a 3'

UL 48P26 re: 5' gtg cca ggc ggt gct cac cag ata a 3'

UL 48P27 fw: 5' gcc aca gat ctc gca gta cga cct a 3'

UL 48P28 re: 5' ggg cct acc tgg cac agt tgc tgt a 3'

UL 48P29 fw: 5' ccc gaa cag gtc aag gcc ttc tgt a 3'

UL 48P30 re: 5' aca tgc acg cc gaga cac acg ggt a 3'

UL 48P31 fw: 5' atc cgc gtg cca cgt cag gac aca a 3'

UL 48P32 re: 5' cca gcc gac tgt ggt cct gtt cga a 3'

UL 48P33 fw: 5' gcg ttt ccc cac ccg cct aga gtt t 3'

UL 48P34 re: 5' tga tag gcg gcg agg cga aac tgg t 3'

UL 48P35 fw: 5' gcg ttt ccc cac ccg ctt aga gtt t 3'

UL 48P36 re: 5' tga tag gcg gcg agg cga tgg 3'

UL 48P37 fw: 5' tac cgc ctt tgg cgg gtc cgt ctt t 3'

UL 48P 38 re: 5' cgt ttt gga gct gcc gac cga gat a 3'

UL 48P39 fw: 5' gca aca ggt cca gct taa agg cgc a 3'

UL 48P40 re: 5' ccg tgt acg atc acc ggc tgg ctt t 3'

## Primer für UL 24 Roth, Karlsruhe

UL 24P1 fw: 5' tcg cgg tcg cgc gtc ggt gga caa a 3'

UL 24 P2 re: 5' gtg gaa ggc ggt cac ttg ctg cgc a 3'

UL 24 P3 fw: 5' gag aac gcg cat tcc gaa agc ggt t 3'

UL 24 P4 re: 5' agg aga tcg aga cgg acg agg act t 3'

UL 24 P5 fw: 5' ctc caa gcc ttc acg tcc tcc ggt t 3'

UL 24 P6 re: 5' gaa aac gct gtc ctc cgc ctc ctc a 3'

## Primer für UL 128-131 Roth, Karlsruhe

UL 128-131 P1 fw: 5' cgt cgt caa gaa cgg cgt cag gtc t 3'

UL 128-131 P2 re: 5' ggg gtt cca gca ggt atc aac ggg t 3'

UL 128-131 P3 fw: 5' ccc agg tgg agc ttc tct cca cca a 3'

UL 128-131 P4 re: 5' ccg agg tgt cgt tgc tca tca gcg a 3'

UL 128-131 P5 fw: 5' ccg gcg gcg ttg aac gtg gtc ctt t 3'

UL 128-131 P6 re: 5' tcc ccg ccc cat cac ctc gcc tat a 3'

UL 128-131 P7 fw: 5' agc cac acc cga cac agc cgc atg t 3'

UL 128-131 P8 re: 5' gcg gtt ccc gac gag gtt ctc aga t 3'

UL 128-131 P9 fw: 5' ctc ctc ctc gtc cca gtc ccg agt t 3'

UL 128-131 P10 re: 5' cct cgt tac acg tcg ttc gcg gac a 3'

UL 128-131 P11 fw: 5' att ttt cca ata tcg cca tct cta t 3'

UL 128-131 P12 re: 5' gac gag ctg caa cta caa tcc gta a 3'

UL 128-131 P13 fw: 5' cat agg ctg taa ggc cct cga gga a 3'

UL 128-131 P14 re: 5' ttt tga aaa ccg cgc gtc atg agt c 3'

### **3.1.8 Enzyme**

EcoRI, SacI, BamHI, SstI, XbaI, HindIII, Qbiogene, Heidelberg

T4-DNA-Polymerase, Stratagene, La Jolla, USA

Taq-Polymerase, Roche, Mannheim

### **3.1.9 Kits**

ABI PRISM® BigDye™ Terminator

Cycle Sequencing Ready Reaction Kit Applied Biosystems, Weiterstadt

NucleoSpin Multi 8 Exact Kit Macherey-Nagel, Düren

### **3.1.10 Geräte**

Peltier Thermal Cycler 200 MJ Research, Waltham, USA

BIO Photometer, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer Applied Biosystems, Weiterstadt

Gel Doc 2000 Bio Rad, München



## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Zellkulturverfahren**

Die Kultivierung aller Zellen erfolgte bei 37°C, 5%CO<sub>2</sub> und 90% Luftfeuchtigkeit in einem Begasungsbrutschrank.

### **3.2.2 Isolierung und Kultur der Zellen**

#### ***Humane Vorhautfibroblasten (HFF)***

Für die Isolierung von humanen Vorhautfibroblasten wurden Beschneidungsabschnitte (Universitätsklinik Tübingen) mechanisch mit einem Skalpell zerkleinert und anschließend mit 50ml Trypsin eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde die Lösung durch eine dünne Lage Mull in ein steriles Gefäß filtriert. Je 25ml der Lösung wurden mit Medium auf 50ml aufgefüllt und bei 250g ohne Bremse für 10min zentrifugiert. Das so gewonnene Pellet wurde in 5ml MEM Medium (5% FKS, Gentamycin) resuspendiert und bei 250g erneut für 10min zentrifugiert. Das gewaschene Pellet wurde in 6 ml MEM Medium (% FKS, Gentamycin) gelöst und auf eine 25cm<sup>2</sup> Kulturflasche gegeben. Ein Mediumwechsel erfolgte alle drei bis vier Tage.

#### ***Humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVEC)***

Für die Isolierung der humanen Nabelschnurvenen-Endothelzellen (Frauenklinik, Universitätsklinik Tübingen) wurde die Nabelschnur auf einer Seite abgeklemmt und mit Lösung A gefüllt. Nachdem die Nabelschnurvenen mehrmals mit Lösung A gespült worden waren, wurden sie mit Chymotrypsinlösung gefüllt und bei 37°C für 10min inkubiert. Das Eluat wurde bei 250g für 10min zentrifugiert. Das so entstandene Zellpellet wurde resuspendiert und in eine 25cm<sup>2</sup> Kulturschale gegeben. Nach Zelladhärenz wurde das Zellmedium gewechselt. Für die Versuche wurden Endothelzellen aus fünf bis sechs Isolierungen gepoolt und bis zur Verwendung kryokonserviert.

### **3.2.3 DNA-Analyse**

#### **3.2.3.1 Präparation von Virus-DNA mit Nukleaseverdau aus infizierten Zellen**

##### ***DNA- Isolierung***

Zur Isolierung der HCMV-DNA wurden die infizierten Zellen einer 175cm<sup>2</sup>-Zellkulturschale mit kaltem PBS 1x gewaschen und mit 15ml eiskaltem C1-Puffer auf Eis 10min unter Schwenken lysiert. Der Überstand wurde komplett verworfen und die Zellschicht nochmals mit 15ml eiskaltem C1-Puffer für 10min gewaschen. Der Überstand wurde erneut komplett verworfen und die lysierte Zellschicht mit 4ml Nuklease-Lösung bei 37°C für 20min inkubiert. Um die Nuklease-Reaktion zu stoppen wurden 80µl 0,2mol/l EDTA hinzugegeben, geschwenkt und der Überstand wieder komplett verworfen.

##### ***DNA- Extraktion***

Für die DNA-Extraktion wurden 3ml Digestionspuffer (Proteinase K und SDS) zugesetzt und anschließend bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Extraktion der DNA erfolgte dann weiter nach dem Protokoll von D. Wolff (Juli 1993).

Dazu wurden der Zellkulturflasche 6ml Phenol hinzugegeben und anschließend unter nicht zu starkem Schütteln bei Raumtemperatur für 2-3 Stunden inkubiert. Der Inhalt der Zellkulturflasche wurde dann in lösungsmittelresistente Zentrifugenröhrchen überführt und für 10min bei 11.000rpm zentrifugiert. Die DNA-haltige Oberphase wurde anschließend mit einer abgeschnittenen blauen Spitze in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt, dabei war zu beachten, dass die Lösung sehr zäh ist und so das Material der Interphase leicht mitangesaugt werden konnte. Nach Zugabe von 3ml Phenol und 3ml Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1) wurde das Röhrchen 10 mal auf den Kopf und wieder zurückgedreht. Es folgte eine Zentrifugation für 10min bei 11.000rpm. Die entstandene Oberphase wurde mit einer abgeschnittenen blauen Spitze in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und 3ml Chloroform/ Isoamylalkohol

hinzugegeben. Anschließend wurde für 10min bei 11.000rpm durchmischt und zentrifugiert.

### ***Fällung und Isolierung***

Die Oberphase wurde dann in ein neues Röhrchen überführt und vorsichtig mit dem zweifachen Volumen an Isopropanol überschichtet. Dann wurde eine lange Pasteurpipetten an der Spitze kurz am Bunsen-Brenner geschmolzen und ein Häkchen geformt. Für das Aufspulen der DNA in der Interphase wurde das Häkchen kreisförmig, aber auch auf- und abbewegt. Dabei sollte die DNA auf jeden Fall sichtbar sein. In dieser Form war die DNA gut für die Transfektion geeignet.

Für die verbliebene DNA wurde das Röhrchen mit 3-4 Saltos gedreht damit sich die Phasen durchmischten. Dabei präzipitierte die DNA und konnte so leichter mit einem Häkchen aufgespult werden. Diese DNA zeigte allerdings nach Transfektion eine weniger hohe Infektiosität.

Die Pasteurpipette wurde anschließend zum Trocknen für eine Stunde bei Raumtemperatur in einen Ständer aufgestellt, wobei hier keine sterilen Bedingungen vorliegen mussten. Die Pasteurpipette wurde dann in ein Eppendorfgefäß nach unten gestellt und so abgebrochen, dass das Eppendorfgefäß geschlossen werden konnte. Es wurden 100 bis 300µl H<sub>2</sub>O zugegeben, dabei durfte mit der Pipette nicht resuspendiert werden.

Resuspendiert wurde bei 4°C über Nacht. Bei dieser Temperatur wurde auch gelagert.

Anschließend wurde die DNA-Konzentrationsbestimmung und Probe-Restriktionsspaltung (wie unten beschrieben) durchgeführt.

Alternativ zum Aufspulen der DNA mittels eines Häkchens wurde auch folgendermaßen vorgegangen, da es sich hier um keine zelluläre DNA handelte:

Wie oben wurde die überführte Oberphase mit 6ml Isopropanol vorsichtig überschichtet und dann die DNA mittels Saltos gefällt. Anschließend wurde für 30min bei 11.000rpm zentrifugiert, wonach ein DNA-Pellet sichtbar wurde. Das Phenol wurde nun vorsichtig abgegossen und 1ml 70%iges Ethanol hinzupipettiert, um die noch verbliebenen Salze herauszulösen. Dieser wurde wieder vorsichtig abgegossen und wieder 1ml 70%iges Ethanol hinzugegeben. Die Lösung wurde nun mit dem Pellet in ein Eppendorfgefäß überführt und bei 14.000rpm für 2min zentrifugiert. Anschließend wurde unter dem Abzug mit einer sterilen Pipette das Ethanol vorsichtig abgesaugt und bei offenem Gefäß das Pellet für ca. 10min getrocknet. Anschließend wurden 20µl TE-Puffer (pH 8, Tris EDTA) hinzugegeben, das Gefäß verschlossen und über Nacht bei 4°C gekühlt.

### ***Konzentrationsbestimmung der DNA***

Zunächst erfolgte eine DNA-Konzentrationsbestimmung am Photometer (BIO Photometer, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) bei 260 nm. Dazu wurde in ein Eppendorfgefäß 6µl DNA-Lösung und 54µl H<sub>2</sub>O gemischt. Das Photometer wurde mit H<sub>2</sub>O geeicht und die Verdünnung eingegeben, hier 5:45. Beim Ergebnis sollte der errechnete Quotient bei 260/230 zwischen 1,8 und 2,0 liegen, um eine qualitativ gute DNA zu gewährleisten. Anschließend musste noch die absolute DNA-Konzentration rechnerisch bestimmt werden.

### ***Qualitätsüberprüfung der isolierten DNA***

Für die Überprüfung der Qualität der isolierten DNA wurde die Restriktionsfragment-Längenanalyse (RFLA) durchgeführt. Die DNA-Spaltung mit einem Überschuss an Restriktionsenzymen wurde in den vom Hersteller mitgelieferten Puffersystemen bei empfohlenen Inkubationstemperaturen durchgeführt. Dabei wurden folgende Regeln beachtet: Für ein langes DNA-Gel wurden etwa 5µg genomische DNA verwendet. Die Enzymkonzentration lag bei 5-10U/µg DNA. Das Gesamtvolumen entsprach mindestens einem 10-fachen des Enzymvolumens. Es wurde 1/10 des Gesamtvolumens vom passenden

Puffer verwendet (10-fach). Aufgefüllt wurde mit DNase-freiem H<sub>2</sub>O auf das Gesamtvolumen. Inkubiert wurde bei Temperaturoptimum für 60min und die Inkubation durch Zugabe der entsprechenden Menge an 6-fach Probenpuffer beendet.

Nach der Zugabe von 10-fach Bromphenolblau-Auftragspuffer zum Spaltansatz (mit Gesamtvolumen von 20µl) erfolgte die Auftrennung der DNA-Fragmente in 0,6-0,8%-igen Agarosegelen in 1x TBE-Puffer und versetzt mit 1µg/ml Ethidiumbromid. Als Fragmentlängenstandard diente Raoul-Marker (1:10). Die Elektrophorese wurde zwischen 40V und 100V in 1-fach TBE-Puffer durchgeführt. Im Gel wurden die DNA-Fragmente unter UV-Licht (2564nm) sichtbar gemacht und mit einer Polaroidkamera dokumentiert

### **3.2.3.2 Shotgunklonierung von Virus-DNA aus infizierten Zellen in den Vektor pZErO™ -1.1**

#### **Restriktionsverdau**

Es wurde je ein Restriktionsverdau für die isolierte DNA (wie oben beschrieben) und für den Vektor angesetzt, und zwar mit einem Gesamtvolumen von 40µl für die DNA und von 20µl für den Vektor. Damit wurde ein möglichst optimales Verhältnis von Vektor zu insert-DNA, nämlich 1:2 angestrebt.

Dazu kamen Enzym und 1/10 des Gesamtvolumens an Puffer, anschließend wurde mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt.

Der Gesamtansatz wurde gut durchmischt, kurz zentrifugiert und anschließend bei 37°C für 30min in den Wärmer gestellt.

In dieser Zeit wurden die phase-lock-gel Light tubes (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) für die Extraktion vorbereitet und 30sec bei 14.000rpm herunterzentrifugiert. Dann wurden je 100µl Phenol/Chloroform pro Gefäß hinzugegeben. Anschließend wurde zum DNA- und pZErO-Ansatz auf 100µl mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt, entsprechend bei der DNA 60µl und bei pZErO je 80µl. Danach wurden die DNA- und pZErO-Lösungen in die vorbereiteten phase-lock-gel Light

tubes (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) überführt und das ganze durchmischt, bis eine weiße Emulsion entstand. Es folgte eine Zentrifugation für 5min bei 14.000rpm. Anschließend wurden pro Ansatz 100µl Chloroform hinzugegeben, durchmischt und wieder für 5min bei 14.000rpm zentrifugiert. Die Ansätze wurden in normale Eppendorfgefäße überführt und jeweils 200µl gekühltes Ethanol absolut hinzugegeben und bei 4°C im Kühlschrank gekühlt. Dann wurden die Ansätze in der auf 4°C abgekühlten Zentrifuge für 20min bei 14.000rpm zentrifugiert

Anschließend wurde das Ethanol unter dem Abzug mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgesaugt und je 200µl gekühltes 70%iges Ethanol hinzugegeben und durchmischt. Es folgte eine weitere Zentrifugation für 5min bei 14.000rpm. Dann wurde das Ethanol wieder unter dem Abzug vorsichtig abgesaugt und bei offenen Gefäßen trocknen lassen. Um die entstanden Pellets wieder zu lösen wurden den DNA-Ansätzen 40µl und den pZEro-Ansätzen 20µl TE-Puffer (pH 8) hinzugegeben.

### ***Ligation***

Für die Ligation wurden bei einem typischen Ansatz 2µl H<sub>2</sub>O und 2µl 5-fach T4 DNA-Ligase-Puffer vorgelegt und anschließend 1µl Vektor, 4µl DNA und 1µl Enzym hinzupipettiert. Dann wurden die Ansätze für 3 Stunden bei 16°C im Wasserbad inkubiert.

### ***Transformation (nach Protokoll von Invitrogen)***

Dazu wurden 2µl des Ligationansatzes zu 50µl kompetenten One shot-Bakterien gegeben und mit 2µl Mercaptoethanol 30min auf Eis inkubiert. Nach genau 30sec im Wasserbad bei 42°C wurden je 250µl vorgewärmtes SOC-Medium zu jedem Ansatz hinzugegeben und bei 37°C eine Stunde bei 225rpm geschüttelt.

Die LB-Zeocin-Agarplatten wurden mit 25-100µl der transformierten Zellen beimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Sichtbare Bakterienkolonien wurden mit dem Qiaprep 8 Turbo Miniprep-Kit von Qiagen präpariert, um die DNA der neu entstanden Klone zu isolieren.

An Hand einer Restriktionsfragmentlängenanalyse wurde die Größe der Plasmid-DNA bestimmt und so nach den UL32 und UL48 entsprechenden Klonen gesucht. Diese wurden dann auf Einzelkolonien ausgestrichen und in einem Zeoxin-haltigen SOC-Medium bei 37°C über Nacht inkubiert. Aus den Bakterien wurde die DNA für die Sequenzierung mit dem Midi-Präparations-Kit von Qiagen präpariert. Die Bakterien wurden in 20%igem Glycerol bei -80°C aufbewahrt.

### **3.2.4 Southern-Blot-Analyse**

Für die Southern-Blot-Analyse wurde der „DIG DNA Labeling und Detection Kit“ von Boehringer, Mannheim verwendet.

Die DNA des Plasmids mit viralem insert, die als Sonde verwendet werden sollte, wurde mit DIG-dUTP nach Angaben des Herstellers markiert.

Für den Southern Blot wurden die DNA-Fragmente durch eine Restriktionsfragmentlängenanalyse in einem Agarosegel aufgetrennt. Das Gel wurde in 1N KOH für 30 min inkubiert, mit 0,5M Tris-HCL pH 7,5 für 30min neutralisiert und anschließend für 5min in 10x SSC eingelegt. Die DNA wurde in 20xSSC für mindestens 3 Stunden auf eine Nylonmembran transferiert und durch anschließendes „UV-Crosslinking“ fixiert. Alternativ konnte die Nylonmembran auch bei Raumluft getrocknet werden. Die Vorhybridisierung wurde mit DIG Easy Hyb für 30min bei 42°C durchgeführt, hybridisiert wurde mit der denaturierten DIG-markierten DNA-Probe nach Abgießen der Vorhybridisierungslösung für mindestens 6 Stunden bei 42°C. Die Waschschrte und Detektion erfolgten nach Angaben des Herstellers.

### **3.2.5 DNA-Sequenzierung**

Die DNA-Sequenzierung der Klone erfolgte mit Primerpaaren der Firma Roth mit einer Primerkonzentration von 50ng/µl und einer DNA-Menge der Plasmide von 1µg.

Ein typischer Ansatz für die Sequenzierungsreaktion enthielt bei einem Gesamtmenge von 10µl, 2µl Sequenziermix (Big Dye Terminator Cycle Applied B), 1µl Primer und 1µl Plasmid-DNA und 6µl H<sub>2</sub>O.

Das Cyclerprogramm ABI am Gerät ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer lautete: Schritt 1: 2min bei 96 °C, Schritt 2: 10sec bei 96 °C, Schritt 3: 5sec bei 50 °C, Schritt 4: 4min bei 60°C. Die Schritte 2-4 wurden 30x wiederholt. Zum Schluss wurde auf 4°C abgekühlt.

Der typische Ansatz für die Fällungsreaktion enthielt 10µl Ansatz, 10µl Dextranblau (1mg/ml), 10µl NaAc (3M, pH 5), 70µl H<sub>2</sub>O und 250µl gekühltes Ethanol absolut. Nach Durchmischung wurde für 30min bei 14.000rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert und anschließend abgesaugt. Gewaschen wurde dann mit 100µl 70%igem gekühltem Ethanol. Nach erneutem Absaugen wurde das Pellet getrocknet und mit 20µl TSE-Puffer resuspendiert. Es folgte im Cycler nach dem Programm Seq-Heat für 4min eine Abkühlung von 90°C auf 4°C.

Die anschließende Polymerasenkettenreaktion (PCR) erfolgte mit einem Ansatz von 50µl. Das Template bestand aus einer Verdünnung von 1µl DNA in 1ml H<sub>2</sub>O. Der PCR-Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen: 5µl 10x PCR-Puffer, 1µl dNTP, 0,5µl je Primer, 1µl Taq-Polymerase, 1µl Template und 41µl H<sub>2</sub>O. Dieser wurde zentrifugiert, durchmischt und nochmals kurz zentrifugiert. Anschließend folgte im Cycler das folgende Programm: Schritt 1: 4min bei 94°C, 2: 1min bei 94°C, 3: 1min bei 57°C, 4: 1min bei 72°C, wobei die Schritte 2-4 30x wiederholt wurden. Als Schritt 5: 4min bei 72°C und schließlich Abkühlung auf 10°C.

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mit Microcon-Tubes laut Empfehlung des Herstellers.

Der ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer ist in Kombination mit dem hier verwendeten BigDye RR Terminator Kit in der Lage, Fluoreszenzsignale vier verschiedener Farben, welche benutzt wurden, um die Basen Adenin, Guanin,



Cytosin und Thymidin zu bezeichnen, zu unterscheiden und durch die Kettenabbruchreaktion, die DNA-Basenabfolge des zu sequenzierenden Abschnitts wiederzugeben. Die unterschiedlichen Wellenlängen der verschiedenen Farben werden bei der Bestrahlung mit Laserlicht im Sinne einer Extinktionsreaktion genutzt und so die Basenabfolge wiedergegeben. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Computerprogramme DNAsis und CHROMAS.

## 4 Ergebnisse

Da es sich bei dem HCMV-Genom um insgesamt 235 kbp handelt, ist ein direkter Vergleich des gesamten Genoms auf DNA-Ebene nicht möglich. Daher sollte eine gezielte Auswahl von Genen erfolgen, die aus theoretischen Überlegungen heraus eine Rolle für den Zelltropismus von verschiedenen HCMV-Stämmen spielen könnten. Bei dem zu untersuchenden Isolatpaar HCMV 40F und HCMV 40E war der nichtendotheliotrope HCMV-Stamm 40F in seiner Fähigkeit zur DNA-Freisetzung in Endothelzellen um den Faktor 100-1000 reduziert, wohingegen der endotheliotrope Stamm HCMV 40E auch in Endothelzellen zu einem effizienten Uncoating befähigt war. So konnte sich HCMV 40E im Gegensatz zu HCMV 40F in Endothelzellen replizieren. Dabei korrelierte die Effizienz der Translokation viraler DNA mit dem Endothelzelltropismus von HCMV-Varianten.

Beim Transport der Viren von der Peripherie der Wirtszelle zum Zellkern spielen auf viraler Seite besonders die Tegumentproteine eine entscheidende Rolle. Daher waren besonders Gene, die für diese kodieren, von Interesse. Ziel war eine vergleichende Sequenzanalyse und die Klärung der Frage, ob sich in den zu untersuchenden Genen (UL48 und UL32) auf DNA-Ebene Unterschiede zwischen HCMV 40E und HCMV 40F finden würden, ob sich diese auch auf die Aminosäuresequenz auswirken würden und somit eine entscheidende Rolle für den unterschiedlichen Zelltropismus spielen könnten.

Die Methode der Wahl war daher eine vergleichende Sequenzanalyse. Hierzu sollten die Gene der Tegumentproteine mit den Leserahmen UL32 und UL48 kloniert werden. Dazu wurden anhand der DNA-Sequenz des Laborstammes AD169 die Enzyme EcoR1 für den Leserahmen UL32 und SacI für den Leserahmen UL48 ausgewählt, um die entsprechenden Fragmente anschließend in den Vektor pZErO klonieren zu können. Die Klone von UL32 und UL48 sollten über die Nutzung für die vergleichende Sequenzanalyse hinaus später auch zur Herstellung rekombinanter Viren zur Verfügung stehen. Auf diese Weise würde dann die Möglichkeit bestehen zu überprüfen, ob sich

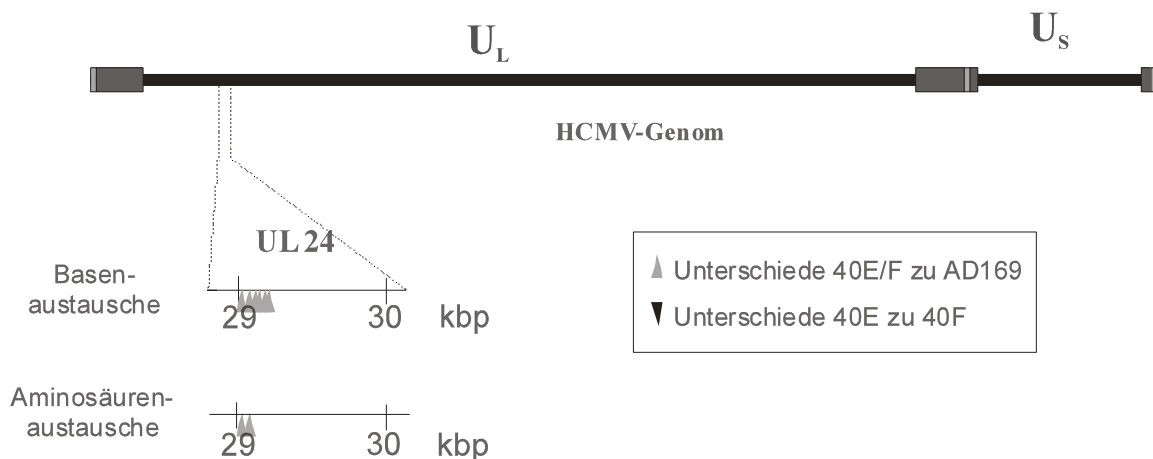
durch Transfer der fraglichen Genomfragmente der jeweilige Zelltropismus auf den Stamm mit gegensätzlichem Phänotyp übertragen lässt. Die für die Klonierung passenden Fragmente sollten aufgrund der vorhergesagten Fragmentgröße identifiziert und durch Southern Blot-Analysen verifiziert werden. Die skizzierten Klonierungsarbeiten wurden erfolgreich durchgeführt. Die Tegumentproteine UL48 und UL32 liegen als pZErO-Klone vor. Im Laufe der Arbeit wurden von anderen Arbeitsgruppen genetische Hinweise auf eine mögliche Bedeutung der offenen Leserahmen UL24 sowie UL128-131A publiziert (Dunn et al., 2003; Hahn et al., 2004). Diese Genregionen wurden mit Hilfe einer Direktsequenzierung viraler DNA untersucht um zu klären, ob die entsprechenden Gene auch für die Phänotypunterschiede im HCMV-Stammpaar 40E und 40F eine Rolle spielen.

Ein Sequenzvergleich des endotheliotropen Stammes 40E und des nichtendotheliotropen Stammes 40F in den offenen Leserahmen UL24, UL32, UL48, UL128, UL130 und UL131A sollte mögliche Unterschiede auf DNA-Ebene feststellen und deren Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz untersuchen. Dabei kamen folgende Ergebniskonstellationen in Frage:

- (1) Es besteht Sequenzidentität auf Basenebene. Daher können auch keine Unterschiede in der Aminosäuresequenz entstehen. Somit kann ausgeschlossen werden, dass dieses Gen eine Rolle für den Zelltropismus spielt.
- (2) Es bestehen Unterschiede in der Basensequenz zwischen den untersuchten Stämmen. Diese wirken sich aber nicht auf die Aminosäuresequenz aus. Somit kann auch hier mit hoher Sicherheit ausgeschlossen werden, dass dieses Gen eine Rolle im Bezug auf den untersuchten Phänotyp spielt.
- (3) In der Basensequenz zeigen sich ein oder mehrere Unterschiede, die zu Veränderungen der Aminosäuresequenz führen. Hier besteht potentiell die Möglichkeit, dass diese Unterschiede eine entscheidende Rolle für den verschiedenen Phänotyp Zelltropismus spielen, was dann durch weitere funktionelle Untersuchungen abgeklärt werden müsste.

#### 4.1 Die Tegumentproteine UL24 und UL48 tragen nicht zu Zelltropismusunterschieden zwischen den Stämmen HCMV 40E und HCMV 40F bei

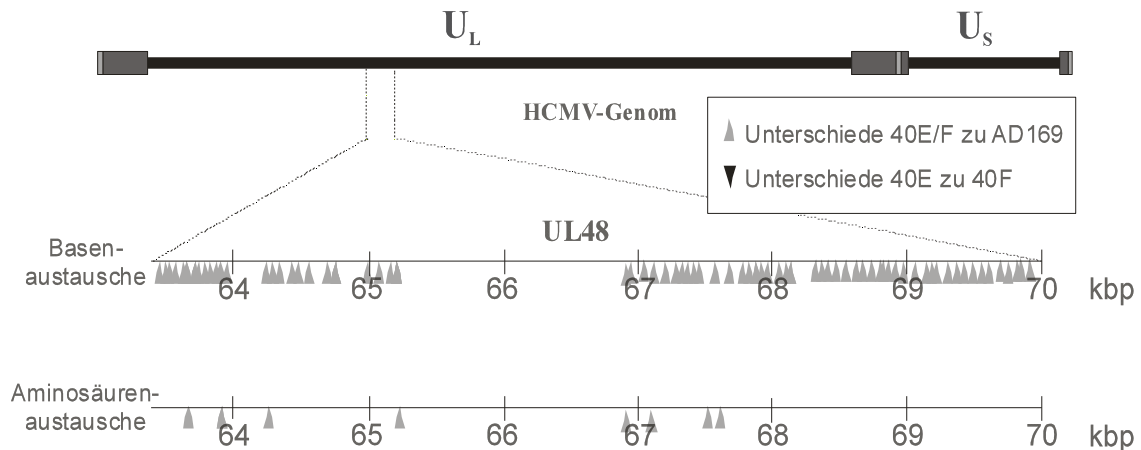
Der offene Leserahmen UL24 (Abb. 4) umfasst in der publizierten Sequenz 903 Basenpaare und kodiert für ein Tegumentprotein von 300 Aminosäuren. Die Basensequenz war zwischen dem Stamm AD169 einerseits und den Stämmen 40E und 40F andererseits zu 99,4 % konserviert, die Stämme 40E und 40F waren sequenzidentisch (Anhang 1). Entsprechend waren diese Stämme auch in ihrer Proteinsequenz identisch, während sie gegenüber der publizierten Sequenz von AD169 zwei Aminosäureaustausche aufwiesen (Anhang 2). Eine der Aminosäuren-Mutationen ist konservativ (G79A), bei der anderen ändert sich im Sinne einer "missense"-Mutation der Charakter der Aminosäure von ungeladen-polar nach sauer (Q66E). Auffällig ist, dass alle Basen-Mutationen im zweiten Sechstel des Leserahmens akkumuliert sind und die restlichen fünf Sechstel komplett konserviert sind, was auf eine zusätzliche Funktion dieser DNA-Abschnitte über die Proteinkodierung hinaus schließen lässt.



**Abb. 4:** Schematische Darstellung der Unterschiede in Basen- und Aminosäuresequenz zwischen HCMV 40 E/F und HCMV AD169 im offenen Leserahmen UL 24. HCMV 40E/F waren sequenzidentisch. Es zeigten sich 2 Aminosäureaustausche im Vergleich HCMV 40 E/F zu HCMV AD169.

Der offene Leserahmen UL48 (Abb. 5) umfasst in der publizierten Sequenz 6726 Basenpaare und kodiert für ein Tegumentprotein von 2241 Aminosäuren. Die Basensequenz war zwischen dem Stamm AD169 einerseits und den Stämmen 40E und 40F andererseits zu 98,7 % konserviert, die Stämme 40E und 40F waren sequenzidentisch (Anhang 3). Entsprechend waren diese Stämme auch in ihrer Proteinsequenz identisch, während sie gegenüber der publizierten Sequenz von AD169 14 Aminosäureaustausche und eine Aminosäurendeletion aufwiesen (Anhang 4). Unter den Aminosäureaustauschen überwiegen konservative Mutationen, bei denen der Charakter der Aminosäure erhalten bleibt. Es finden sich aber auch fünf "missense"-Mutationen, die den Charakter der Aminosäure jeweils von unpolar nach polar verändern: so sind an den Positionen 212 und 1940 der Aminosäuresequenz jeweils Prolin durch Serin, an den Positionen 1347 und 2756 jeweils Alanin durch Threonin sowie an Position 1917 Prolin durch Arginin ersetzt. Die 83 Basenaustausche und 3 Basendeletionen sind relativ gleichmäßig über den Leserahmen verteilt mit einer bemerkenswerten Ausnahme: der zentrale Bereich von nt 2411-3983 ist komplett konserviert, was wiederum auf eine funktionelle Bedeutung dieses DNA-Abschnittes über die Proteinkodierung hinaus hinweist.

Die Sequenzidentität der Stämme 40E und 40F in den Leserahmen UL24 und UL48 auf DNA-Ebene und folglich auch auf Proteinebene schließt eine Bedeutung dieser Gene für die Ausprägung des Zelltropismusunterschiedes zwischen beiden Stämmen nahezu sicher aus. Auf dem Hintergrund der zahlreichen Sequenzunterschiede zum Laborstamm AD169 bestätigt die Sequenzidentität von 40E und 40F das enge Verwandtschaftsverhältnis dieser beiden HCMV-Stämme.



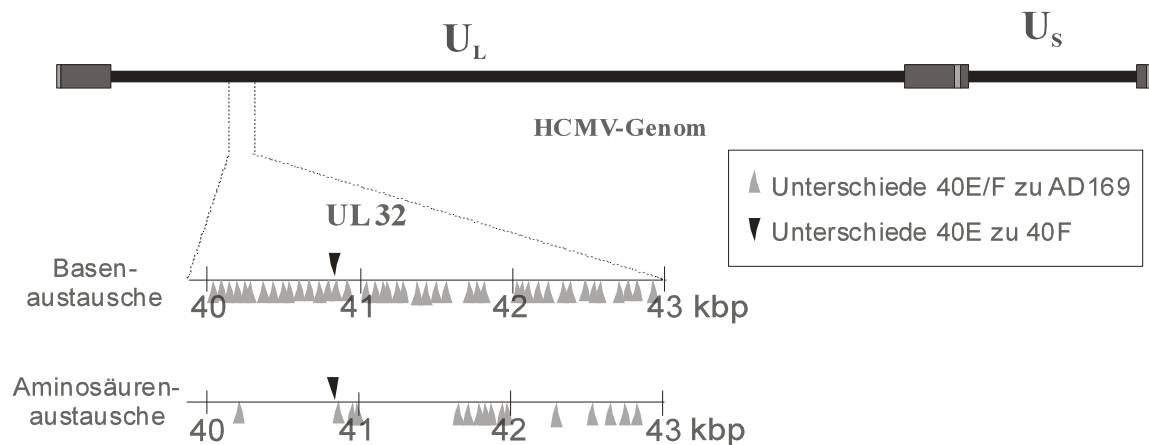
**Abb.5:** Schematische Darstellung der Unterschiede in Basen- und Aminosäuresequenz im offenen Leserahmen **UL 48**. HCMV 40E/F waren sequenzidentisch. Im Vergleich von HCMV 40E/F zu HCMV AD169 zeigten sich 14 Aminosäureaustausche und eine Aminosäurendeletion.

#### **4.2 Im Leserahmen von UL32 zeigt sich ein Sequenzunterschied zwischen HCMV 40E und HCMV 40F.**

Der offene Leserahmen UL32 (Abb. 6) umfasst in der publizierten Sequenz 3150 Basenpaare und kodiert für ein Tegumentprotein von 1048 Aminosäuren. Die Basensequenz (Anhang 5) war zwischen dem Stamm AD169 einerseits und den Stämmen 40E und 40F andererseits zu 98,6 % konserviert, die Stämme 40E und 40F wiesen einen Basenaustausch auf (Abb. 7), der sich auch auf die Aminosäuresequenz auswirkt (Abb. 8 und Anhang 6). Der Stamm 40F hat an Position 308 wie auch AD169 ein Leucin, während beim Stamm 40E an dieser Position ein Phenylalanin steht. Der nichtpolare Charakter bleibt also bei dieser Mutation erhalten. Der Vergleich von AD169 einerseits und 40E/40F andererseits zeigt neben 6 konservativen Mutationen auch 5 "missense"-Mutationen, zwei Insertionen und eine Deletion: bei Y657H ist das ungeladenpolare Tyrosin durch ein basisches Histidin ersetzt; bei R693Q ist das basische Arginin durch ein ungeladen-polares Glutamin ersetzt, bei D694N ist die saure Asparaginsäure durch ein ungeladen-polares Asparagin ersetzt, bei A695T ist das unpolare Alanin durch ein ungeladen-polares Threonin ersetzt, bei N1045K

ist das ungeladene polare Asparagin durch ein basisches Lysin ersetzt, ein Asparaginsäure-Stretch von 431-436 weist bei 40E/F eine Asparaginsäure mehr auf, an Position 689 ist ein Asparagin deletiert, an Position 900 ist ein Valin eingefügt (Abb. 8).

Die 35 Basenaustausche, 6 Baseninsertionen und 3 Basendeletionen sind relativ gleichmäßig über den Leserahmen verteilt, wohingegen die Aminosäuresequenz in der N-terminalen Hälfte deutlich besser konserviert ist als in der C-terminalen Hälfte. Dies weist auf eine besondere funktionelle Bedeutung dieses Protein-Abschnittes hin.



**Abb.6:** Schematische Darstellung der Unterschiede in Basen- und Aminosäuresequenz zwischen HCMV 40 E/F und HCMV AD 169 im offenen Leserahmen  $UL32$ . Im Vergleich von HCMV 40E zu HCMV 40F zeigte sich ein Basenaustausch, der sich auf die Aminosäuresequenz auswirkt.

```

751 CGCAATATCCTCAAGCACGCCGTGGAAAACGGCGACTCGGCCGACACGCT UL32 AD169.SEQ
751 CGCAATATCCTCAAGCACGCCGTGGAAAACGGCGACTCGGCCGACACGCT UL32 40E.SEQ
751 CGCAATATCCTCAAGCACGCCGTGGAAAACGGCGACTCGGCCGACACGCT UL32 40F.SEQ

801 GTTGGAGCTGCTCATCGAGGACTTTGATATCTACGTGGACAGCTTCCCAC UL32 AD169.SEQ
801 GCTGGAGCTGCTCATCGAGGACTTTGATATCTACGTGGACAGCTTCCCAC UL32 40E.SEQ
801 GCTGGAGCTGCTCATCGAGGACTTTGATATCTACGTGGACAGCTTCCCAC UL32 40F.SEQ

851 AGTCGGCGCACACCTTTTTGGGCGCGCGCTCGCCGTCGTTGGAGTTTGAAC UL32 AD169.SEQ
851 AGTCGGCGCACACCTTTTTGGGCGCGCGCTCGCCGTCGTTGGAGTTTGAAC UL32 40E.SEQ
851 AGTCGGCGCACACCTTTTTGGGCGCGCGCTCGCCGTCGTTGGAGTTTGAAC UL32 40F.SEQ

901 GATGACGCCAATCTCCTCTCGCTCGGCGGCGGTTCCGCCTTCTCGTCGGT UL32 AD169.SEQ
901 GATGACGCCAATCTCCTCTCGCTCGGCGGCGGTTCCGCCTTCTCGTCGGT UL32 40E.SEQ
901 GATGACGCCAATCTCCTCTCGCTCGGCGGCGGTTCCGCCTTCTCGTCGGT UL32 40F.SEQ

951 ACCCAAGAAACATGTCCCCACGCAGCCGCTGGACGGCTGGAGCTGGATCG UL32 AD169.SEQ
951 ACCCAAGAAACATGTCCCCACGCAGCCGCTGGACGGCTGGAGCTGGATCG UL32 40E.SEQ
951 ACCCAAGAAACATGTCCCCACGCAGCCGCTGGACGGCTGGAGCTGGATCG UL32 40F.SEQ

1001 CAGTCCCTGGAAGGGACACAAACCGTTCCGCTTCGAGGCCCATGGTTCT UL32 AD169.SEQ
1001 CAGTCCCTGGAAGGGACACAAACCGTTCCGCTTCGAGGCCCATGGTTCT UL32 40E.SEQ
1001 CAGTCCCTGGAAGGGACACAAACCGTTCCGCTTCGAGGCCCATGGTTCT UL32 40F.SEQ

1051 CTGGCACCGGCCGCCGAGGCCACGCTGCCCGTTCGGCGGCCGTCGGCTA UL32 AD169.SEQ
1051 CTGGCACCGGCCGCCGAGGCCACGCTGCCCGTTCGGCGGCCGTCGGCTA UL32 40E.SEQ
1051 CTGGCACCGGCCGCCGAGGCCACGCTGCCCGTTCGGCGGCCGTCGGCTA UL32 40F.SEQ

1101 TTACGACGAAGAGGAAAAGCGTCGCGAGCGGCAGAAACGGGTGGACGACG UL32 AD169.SEQ
1101 TTACGACGAAGAGGAAAAGCGTCGCGAGCGGCAGAAACGGGTGGACGACG UL32 40E.SEQ
1101 TTACGACGAAGAGGAAAAGCGTCGCGAGCGGCAGAAACGGGTGGACGACG UL32 40F.SEQ

1151 AGGTGGTGCAGCGTGAGAAACAGCAGCTGAAGGCTTGGGAGGAGAGGCAG UL32 AD169.SEQ
1151 AGGTGGTGCAGCGTGAGAAACAGCAGCTGAAGGCTTGGGAGGAGAGGCAG UL32 40E.SEQ
1151 AGGTGGTGCAGCGTGAGAAACAGCAGCTGAAGGCTTGGGAGGAGAGGCAG UL32 40F.SEQ

1201 CAGAACC'TGCAGCAACGT'CAGCAGCAACCACCGCCCCCGGCACGTAAACC UL32 AD169.SEQ
1201 CAGAACC'TGCAGCAACGT'CAGCAGCAACCACCGCCCCCGGCACGTAAACC UL32 40E.SEQ
1201 CAGAACC'TGCAGCAACGT'CAGCAGCAACCACCGCCCCCGGCACGTAAACC UL32 40F.SEQ

1251 GAGCGCCTCCCGGAGGCTCTTTGGCTCCAGTGCCGATGAGGACGACGACG UL32 AD169.SEQ
1251 GAGCGCCTCCCGGAGGCTCTTTGGCTCCAGTGCCGATGAGGACGACGACG UL32 40E.SEQ
1251 GAGCGCCTCCCGGAGGCTCTTTGGCTCCAGTGCCGATGAGGACGACGACG UL32 40F.SEQ

1301 A-----TGATGATGACGAGAAAAACATCTTTACGCCCATCAAGAAACCGGGA UL32 AD169.SEQ
1301 ACCGATGATGATGACGAGAAAAACATCTTTACGCCCATCAAGAAACCGGGA UL32 40E.SEQ
1301 ACCGATGATGATGACGAGAAAAACATCTTTACGCCCATCAAGAAACCGGGA UL32 40F.SEQ

1348 ACTAGCGGCAAGGGCGCCGCTAGTGGTGGCGGTGTTTCCAGCATTTTCAG UL32 AD169.SEQ
1351 ACTAGCGGCAAGGGCGCCGCTAGTGGTGGCGGTGTTTCCAGCATTTTCAG UL32 40E.SEQ
1351 ACTAGCGGCAAGGGCGCCGCTAGTGGTGGCGGTGTTTCCAGCATTTTCAG UL32 40F.SEQ

1398 CGGCCTGTTATCCTCGGGCAGTCAGAAACCGACCAGCGGTCCCTTGAACA UL32 AD169.SEQ
1401 CGGCCTGTTATCCTCGGGCAGTCAGAAACCGACCAGCGGTCCCTTGAACA UL32 40E.SEQ
1401 CGGCCTGTTATCCTCGGGCAGTCAGAAACCGACCAGCGGTCCCTTGAACA UL32 40F.SEQ

1448 TCCCGCAGCAACAACAGCGTCACGCGGCTTTCAGTCTCGTCTCCCCGCAG UL32 AD169.SEQ
1451 TCCCGCAGCAACAACAGCGTCACGCGGCTTTCAGTCTCGTCTCCCCGCAG UL32 40E.SEQ
1451 TCCCGCAGCAACAACAGCGTCACGCGGCTTTCAGTCTCGTCTCCCCGCAG UL32 40F.SEQ

```

**Abb. 7:** Ausschnitt aus dem DNA-Sequenzvergleich der HCMV-Stämme 40 E, 40F und AD169 im offenen Leserahmen **UL32** mit dem Unterschied an Position 922. Rot unterlegt: Unterschiede im Vergleich von HCMV 40E/F zu HCMV AD169. Schwarz unterlegt: Unterschiede im Vergleich von HCMV 40E zu HCMV 40F und HCMV AD169.



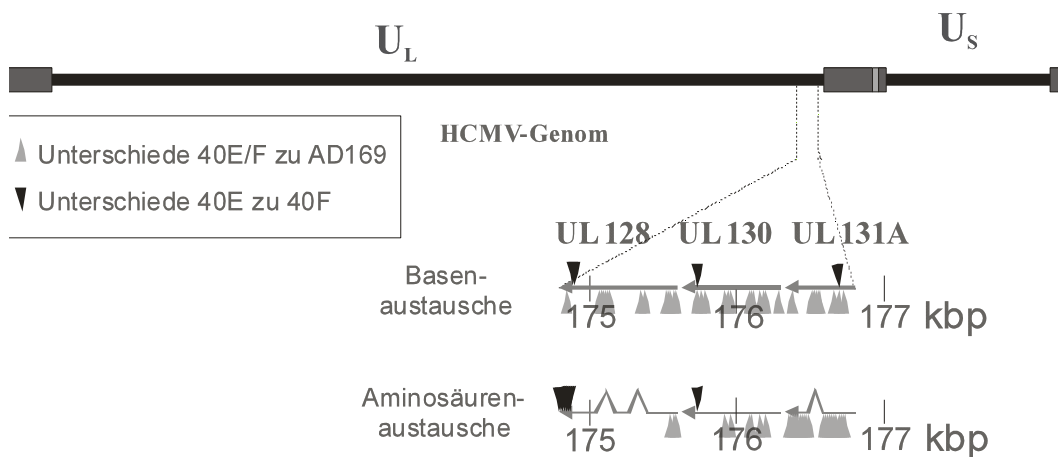
1	MSLQFIGLQRRDVVALVNFLRHLTQKPDVDLEAHPKILKKCGEKRLHRRT	UL32	AD169.SEQ
1	MSLQFIGLQRRDVVALVNFLRHLTQKPDVDLEAHPKILKKCGEKRLHRRT	UL32	40E.SEQ
1	MSLQFIGLQRRDVVALVNFLRHLTQKPDVDLEAHPKILKKCGEKRLHRRT	UL32	40F.SEQ
151	VLFNELMLWLGGYRELRFHNPDLSSVLEEFVRCVAVARRGYTYPFGDRG	UL32	AD169.SEQ
151	VLFNELMLWLGGYRELRFHNPDLSSVLEEFVRCVAVARRGYTYPFGDRG	UL32	40E.SEQ
151	VLFNELMLWLGGYRELRFHNPDLSSVLEEFVRCVAVARRGYTYPFGDRG	UL32	40F.SEQ
301	KARDHLAVLDRTEFDTDVRHDAEIVERALVSAVILAKMSVRETTLVTAIGQ	UL32	AD169.SEQ
301	KARDHLAVLDRTEFDTDVRHDAEIVERALVSAVILAKMSVRETTLVTAIGQ	UL32	40E.SEQ
301	KARDHLAVLDRTEFDTDVRHDAEIVERALVSAVILAKMSVRETTLVTAIGQ	UL32	40F.SEQ
451	TEPIAFVHLKDTEVQRIEENLEGVRRNMFCVKPLDLNLDHRHANTALVNAV	UL32	AD169.SEQ
451	TEPIAFVHLKDTEVQRIEENLEGVRRNMFCVKPLDLNLDHRHANTALVNAV	UL32	40E.SEQ
451	TEPIAFVHLKDTEVQRIEENLEGVRRNMFCVKPLDLNLDHRHANTALVNAV	UL32	40F.SEQ
601	NKLVYTGRLIMNVRRSWEELERKCLARIQERCKLLVKELRMCLSFDSNYC	UL32	AD169.SEQ
601	NKLVYTGRLIMNVRRSWEELERKCLARIQERCKLLVKELRMCLSFDSNYC	UL32	40E.SEQ
601	NKLVYTGRLIMNVRRSWEELERKCLARIQERCKLLVKELRMCLSFDSNYC	UL32	40F.SEQ
751	RNILKHAVENGDSADTLELLIEDFDIYVDSFPQSAHTFLGARSPSLEFD	UL32	AD169.SEQ
751	RNILKHAVENGDSADTLELLIEDFDIYVDSFPQSAHTFLGARSPSLEFD	UL32	40E.SEQ
751	RNILKHAVENGDSADTLELLIEDFDIYVDSFPQSAHTFLGARSPSLEFD	UL32	40F.SEQ
901	DDANLLSFGGGSAFSSVPKKHVPTQPLDGWSWIASPWKGHKPFREFAHGS	UL32	AD169.SEQ
901	DDANLLSFGGGSAFSSVPKKHVPTQPLDGWSWIASPWKGHKPFREFAHGS	UL32	40E.SEQ
901	DDANLLSFGGGSAFSSVPKKHVPTQPLDGWSWIASPWKGHKPFREFAHGS	UL32	40F.SEQ
1051	LAPAADBAHAARSAAVGYDYDEEEKRRERQKRVDDDEVVQREKQQLKAWEERQ	UL32	AD169.SEQ
1051	LAPAADBAHAARSAAVGYDYDEEEKRRERQKRVDDDEVVQREKQQLKAWEERQ	UL32	40E.SEQ
1051	LAPAADBAHAARSAAVGYDYDEEEKRRERQKRVDDDEVVQREKQQLKAWEERQ	UL32	40F.SEQ
1201	QNLQQRQQQPPPPARKPSASRRLFGSSADEDDDDDDDEKNIFTPICKPG	UL32	AD169.SEQ
1201	QNLQQRQQQPPPPARKPSASRRLFGSSADEDDDDDDDEKNIFTPICKPG	UL32	40E.SEQ
1201	QNLQQRQQQPPPPARKPSASRRLFGSSADEDDDDDDDEKNIFTPICKPG	UL32	40F.SEQ
1348	TSGKGAASGGGVSSIFSGLLSSGSQKPTSGPLNIPQQQRHAAFSLVSPQ	UL32	AD169.SEQ
1351	TSGKGAASGGGVSSIFSGLLSSGSQKPTSGPLNIPQQQRHAAFSLVSPQ	UL32	40E.SEQ
1351	TSGKGAASGGGVSSIFSGLLSSGSQKPTSGPLNIPQQQRHAAFSLVSPQ	UL32	40F.SEQ
1498	VTKASPGRVRRDSAWDVRPLTETRGLDFSGDESDSSDGYPNRPDPRFT	UL32	AD169.SEQ
1501	VTKASPGRVRRDSAWDVRPLTETRGLDFSGDESDSSDGYPNRPDPRFT	UL32	40E.SEQ
1501	VTKASPGRVRRDSAWDVRPLTETRGLDFSGDESDSSDGYPNRPDPRFT	UL32	40F.SEQ
1648	DTLVDI TD TETS AKPPVT TAYKFEQPTLTFGAGVNPAGAGAA ILTPTPV	UL32	AD169.SEQ
1651	DTLVDI TD TETS AKPPVT TAYKFEQPTLTFGAGVNPAGAGAA ILTPTPV	UL32	40E.SEQ
1651	DTLVDI TD TETS AKPPVT TAYKFEQPTLTFGAGVNPAGAGAA ILTPTPV	UL32	40F.SEQ
1798	NPSTAPAPAPTPTFAGTQTPVNGNSPWAPTAPLPGDMNPANWPRERAWAL	UL32	AD169.SEQ
1801	NPSTAPAPAPTPTFAGTQTPVNGNSPWAPTAPLPGDMNPANWPRERAWAL	UL32	40E.SEQ
1801	NPSTAPAPAPTPTFAGTQTPVNGNSPWAPTAPLPGDMNPANWPRERAWAL	UL32	40F.SEQ
1948	RNPHLAHNPFRMPTTSTASQNTVSTTPRRPSTPRAAVTQTASRDAADEVW	UL32	AD169.SEQ
1951	RNPHLAHNPFRMPTTSTASQNTVSTTPRRPSTPRAAVTQTASQNTADEVW	UL32	40E.SEQ
1951	RNPHLAHNPFRMPTTSTASQNTVSTTPRRPSTPRAAVTQTASQNTADEVW	UL32	40F.SEQ
2098	ALRDQTAESPVEDSEEEEDDDSSDTGSVVSLGHTTPSSDYNDVISPPSQT	UL32	AD169.SEQ
2101	ALRDQTAESPVEDSEEEEDDDSSDTGSVVSLGHTTPSSDYXXDVISPPSQT	UL32	40E.SEQ
2101	ALRDQTAESPVEDSEEEEDDDSSDTGSVVSLGHTTPSSDYXXDVISPPSQT	UL32	40F.SEQ

**Abb. 8:** Ausschnitt aus dem Aminosäuresequenzvergleich der HCMV Stämme 40 E, 40F und AD169 im offenen Leserahmen **UL32** mit dem Unterschied an Position 908. Rot unterlegt: Unterschiede im Vergleich von HCMV 40E/F zu HCMV AD169. Schwarz unterlegt: Unterschiede im Vergleich von HCMV 40E zu HCMV 40F und HCMV AD169.

### **4.3 Der Genombereich UL128-131A weist Polymorphismen zwischen HCMV 40E und HCMV 40F auf.**

Der offene Leserahmen UL128 (Abb. 9) umfasst in der publizierten Sequenz 758 Basenpaare. Von diesem Leserahmen wird eine RNA transkribiert in der drei kodierende Exonbereiche von zwei nichtkodierenden Intronbereichen unterbrochen werden. Die gespleißte mRNA kodiert für ein Protein von 171 Aminosäuren. Die Basensequenz war zwischen dem Stamm AD169 einerseits und den Stämmen 40E und 40F andererseits zu 97,2 % konserviert, die Stämme 40E und 40F unterschieden sich durch eine Deletion von zwei Basen im dritten Exon von 40E (Abb. 9), was sich auf Aminosäureebene als Leserasterverschiebung auswirkt (Abb. 10). Der endotheliotrope Stamm 40E unterscheidet sich vom Stamm 40F durch eine von Position 136-152 komplett veränderte Aminosäuresequenz. Dann führt ein durch die Leserasterverschiebung entstandenes Stoppcodon zum Translationsabbruch, wohingegen 40F noch weitere 9 Aminosäuren aufweist. Dieser C-terminale Teil ist bei dem nichtendotheliotropen Stämmen 40F und AD169 identisch. Nur im N-terminalen Bereich des UL128-Proteins gibt es drei Aminosäureunterschiede zwischen AD169 einerseits und 40E/40F andererseits. Bei allen drei Mutationen ändert sich der Charakter der Aminosäure. Bei D5N ist eine Asparaginsäure durch ein polares Asparagin ersetzt, bei T12A ist ein polares Threonin durch ein nichtpolares Alanin ersetzt, bei G18D ist das nichtpolare Glycin durch eine Asparaginsäure ersetzt.

Ein Großteil der 21 Mutationen auf DNA-Ebene akkumuliert in den beiden Introns, was gegen eine regulatorische Funktion dieser nichtkodierenden Regionen spricht.



**Abb 9:** Schematische Darstellung der Unterschiede in Basen- und Aminosäuresequenz zwischen HCMV 40 E/F und HCMV AD169 im offenen Leserahmen **UL128, 130, 131A**. Im Vergleich HCMV 40E zu HCMV 40F zeigte eine Deletion von 2 Basen im 3. Exon von HCMV 40E, wodurch eine Leserasterverschiebung auf Aminosäureebene entstand. HCMV 40E zeigte von Position 136-152 eine komplett veränderte Aminosäuresequenz.

**Abb. 10 (rechte Seite):** DNA-Sequenzvergleich der HCMV Stämme 40 E, 40F und AD169 im offenen Leserahmen **UL128**. Rot unterlegt sind Unterschiede im Vergleich von HCMV 40E/F zu HCMV AD169. Schwarz unterlegt sind Unterschiede im Vergleich von HCMV 40E zu HCMV 40F und HCMV AD169.

1 ATGAGTCCCAAACACCTGACGCCGTTCTTGACGACCGTTGTGGCTGCTATT UL128 AD169.SEQ  
1 ATGAGTCCCAAACACCTGACGCCGTTCTTGACGACCGTTGTGGCTGCTATT UL128 40E.SEQ  
1 ATGAGTCCCAAACACCTGACGCCGTTCTTGACGACCGTTGTGGCTGCTATT UL128 40F.SEQ  
  
51 GGCTCACAGCCGCGTGCCGCGGGTACGCGCAGAAGAATGTTGCGAATTCA UL128 AD169.SEQ  
51 GGATCACAGCCGCGTGCCGCGGGTACGCGCAGAAGAATGTTGCGAATTCA UL128 40E.SEQ  
51 GGATCACAGCCGCGTGCCGCGGGTACGCGCAGAAGAATGTTGCGAATTCA UL128 40F.SEQ  
  
101 TAAACGTCAACCACCCGCCGGAACGCTGTTACGATTTCAAAATGTGCAAT UL128 AD169.SEQ  
101 TAAACGTCAACCACCCGCCGGAACGCTGTTACGATTTCAAAATGTGCAAT UL128 40E.SEQ  
101 TAAACGTCAACCACCCGCCGGAACGCTGTTACGATTTCAAAATGTGCAAT UL128 40F.SEQ  
  
151 CGCTTACCGTCGCGTACGTATTTTTATGATTGTCTGCGTTCTGTGGTGC UL128 AD169.SEQ  
151 CGCTTACCGTCGCGTACGTATTTTTATGATTGTCTGCGTTCTGTGGTGC UL128 40E.SEQ  
151 CGCTTACCGTCGCGTACGTATTTTTATGATTGTCTGCGTTCTGTGGTGC UL128 40F.SEQ  
  
201 GTCTGGATTTGTCTCTCGACGTTTCTGATAGCCATGTTCCATCGACGATC UL128 AD169.SEQ  
201 GTCTGGATCTGTCTCTCGACGTTTCTGATAGCCATGTTCCATCGACGATC UL128 40E.SEQ  
201 GTCTGGATCTGTCTCTCGACGTTTCTGATAGCCATGTTCCATCGACGATC UL128 40F.SEQ  
  
251 CTCGGGAATGCCAGAGTAGATTTTCATGAATCCACAGGCTGCGGTGTCCG UL128 AD169.SEQ  
251 CTCGGGAATGCCAGAGTAGATTTTCATGAATCCACAGGCTGCGGTGTCCG UL128 40E.SEQ  
251 CTCGGGAATGCCAGAGTAGATTTTCATGAATCCACAGGCTGCGGTGTCCG UL128 40F.SEQ  
  
301 GACGGCGAAGTCTGCTACAGTCCCGAGAAAACGGCTGAGATTCGCGGGAT UL128 AD169.SEQ  
301 GACGGCGAAGTCTGCTACAGTCCCGAGAAAACGGCTGAGATTCGCGGGAT UL128 40E.SEQ  
301 GACGGCGAAGTCTGCTACAGTCCCGAGAAAACGGCTGAGATTCGCGGGAT UL128 40F.SEQ  
  
351 CGTACCACCATGACCCATTCATTGACACGCCAGGTCGTACACAACAAAC UL128 AD169.SEQ  
351 CGTACCACCATGACCCATTCATTGACACGCCAGGTCGTACACAACAAAC UL128 40E.SEQ  
351 CGTACCACCATGACCCATTCATTGACACGCCAGGTCGTACACAACAAAC UL128 40F.SEQ  
  
401 TGACGAGCTGCAACTACAATCCGTAAGTCTCTTCCTCGAGGGCCTTACAG UL128 AD169.SEQ  
401 TGACGAGCTGCAACTACAATCCGTAAGTCTCTTCCTCGAGGGCCTTACAG UL128 40E.SEQ  
401 TGACGAGCTGCAACTACAATCCGTAAGTCTCTTCCTCGAGGGCCTTACAG UL128 40F.SEQ  
  
451 CCTATGGGAGAGTAAGACAGAGAGGGACAAAACATCATTAATAAAAAAG UL128 AD169.SEQ  
451 CCTATGGGAGAGTAAGACAGAGAGGGACAAAACATCATTAATAAAAAAG UL128 40E.SEQ  
451 CCTATGGGAGAGTAAGACAGAGAGGGACAAAACATCATTAATAAAAAAG UL128 40F.SEQ  
  
498 TCTAATTTACGTTTTGTACCCC CCTTCCTCCGTTGTAGGTTATA UL128 AD169.SEQ  
501 TCTAATTTACGTTTTGTACCCC -----CCTTCCTCCGTTGTAGGTTATA UL128 40E.SEQ  
501 TCTAATTTACGTTTTGTACCCC -----CCTTCCTCCGTTGTAGGTTATA UL128 40F.SEQ  
  
548 CCTCGAAGCTGACGGGCGAATACGCTGCGGCAAAGTGAACGACAAGGCGC UL128 AD169.SEQ  
545 CCTCGAAGCTGACGGGCGAATACGCTGCGGCAAAGTGAACGACAAGGCGC UL128 40E.SEQ  
545 CCTCGAAGCTGACGGGCGAATACGCTGCGGCAAAGTGAACGACAAGGCGC UL128 40F.SEQ  
  
598 AGTACCTGCTGGGCGCCGCTGGCAGCGTTCCTATCGATGGATCAACCTG UL128 AD169.SEQ  
595 AGTACCTGCTGGGCGCCGCTGGCAGCGTTCCTATCGATGGATCAACCTG UL128 40E.SEQ  
595 AGTACCTGCTGGGCGCCGCTGGCAGCGTTCCTATCGATGGATCAACCTG UL128 40F.SEQ  
  
648 GAATACGACAAGATAACCCGGATCGTGGGCTGGATCAGTACCTGGAGAG UL128 AD169.SEQ  
645 --ATACGACAAGATAACCCGGATCGTGGGCTGGATCAGTACCTGGAGAG UL128 40E.SEQ  
645 GAATACGACAAGATAACCCGGATCGTGGGCTGGATCAGTACCTGGAGAG UL128 40F.SEQ  
  
698 CGTTAAATAAACACAAACGGCTGGATGTGTGCCGCGCTAAAAATGGGCTATA UL128 AD169.SEQ  
693 CGTTAAATAAACACAAACGGCTGGATGTGTGCCGCGCTAAAAATGGGCTATA UL128 40E.SEQ  
695 CGTTAAATAAACACAAACGGCTGGATGTGTGCCGCGCTAAAAATGGGCTATA UL128 40F.SEQ

```

748 TGCTGCAGTGA                               UL128 AD169.SEQ
743 TGCTGCAGTGA                               UL128 40E.SEQ
745 TGCTGCAGTGA                               UL128 40F.SEQ

```

Decoration 'Decoration #1': Shade (with solid light gray) residues that differ from UL128 AD169.SEQ.

Decoration 'Decoration #2': Shade (with solid black) residues that differ from UL128 40E.SEQ.

### Abb. 10 (Legende siehe Seite 51)

```

1  MSPKDLTPFLTILWLLLDHSRVPRVRAEECCFEFINVNHPPERCYDFKMCN UL128 AD169.SEQ
1  MSPKNLTPFLTALWLLLDHSRVPRVRAEECCFEFINVNHPPERCYDFKMCN UL128 40E.SEQ
1  MSPKNLTPFLTALWLLLDHSRVPRVRAEECCFEFINVNHPPERCYDFKMCN UL128 40F.SEQ

151 RFTVALRCPDGEVCYSPEKTAEIRGIVTTMTHSLTRQVHNKLTSCNYP UL128 AD169.SEQ
151 RFTVALRCPDGEVCYSPEKTAEIRGIVTTMTHSLTRQVHNKLTSCNYP UL128 40E.SEQ
151 RFTVALRCPDGEVCYSPEKTAEIRGIVTTMTHSLTRQVHNKLTSCNYP UL128 40F.SEQ

301 LYLEADGRIRCCKVNDKAQYLLGAAGSVPYRWINLEYDKITRIVGLDQYL UL128 AD169.SEQ
301 LYLEADGRIRCCKVNDKAQYLLGAAGSVPYRWINLIRQDNPDRGPGSVPG UL128 40E.SEQ
301 LYLEADGRIRCCKVNDKAQYLLGAAGSVPYRWINLEYDKITRIVGLDQYL UL128 40F.SEQ

451 ESVKHKHRLDVCRAKMGYMLQ.                    UL128 AD169.SEQ
451 ER.                                         UL128 40E.SEQ
451 ESVKHKHRLDVCRAKMGYMLQ.                    UL128 40F.SEQ

```

Decoration 'Decoration #1': Shade (with solid light gray) residues that differ from UL128 AD169.SEQ.

Decoration 'Decoration #2': Shade (with solid black) residues that differ from UL128 40E.SEQ.

**Abb. 11: Aminosäuresequenzvergleich der HCMV Stämme 40 E, 40F und AD 169 im offenen Leserahmen UL128.** Rot unterlegt sind Unterschiede im Vergleich von HCMV 40E/F zu HCMV AD169. Schwarz unterlegt sind Unterschiede im Vergleich von HCMV 40E zu HCMV 40F und HCMV AD169.

Der offene Leserahmen UL130 (Abb. 9) umfasst in der publizierten Sequenz 645 Basenpaare und kodiert für ein Protein von 214 Aminosäuren. Die Basensequenz war zwischen dem Stamm AD169 einerseits und den Stämmen 40E und 40F andererseits zu 97,7 % konserviert, die Stämme 40E und 40F unterschieden sich durch eine Basenaustausch am C-terminalen Bereich des Proteins (Abb. 12), was sich auf Proteinebene als Aminosäureaustausch an Position 207 auswirkt (Abb. 13). Der endotheliotrope Stamm 40E weist an dieser Stelle ein nichtpolares Cystein auf, das beim nichtendotheliotropen Stamm 40F durch ein polares Serin ersetzt ist. Der nichtendotheliotrope Stamm AD169 entspricht an dieser Stelle jedoch dem endotheliotropen Stamm AD169, so dass dieser Unterschied nicht für eine Erklärung des Zelltropismusunterschiedes zwischen HCMV 40E und 40F in Frage kommt. Der Vergleich von AD169 einerseits und 40E/40F andererseits zeigt insgesamt neben 2 konservativen Mutationen auch 5 „missense“-Mutationen: bei Q76R und bei Q127R ist jeweils das ungeladen-polare Glutamin durch ein basisches Arginin ersetzt; bei S78L ist das ungeladen-polare Serin durch ein nichtpolares Leucin ersetzt, bei Y113H ist das ungeladen-polare Tyrosin durch ein basisches Histidin ersetzt, bei C207S ist im Stamm 40F wie schon erwähnt das unpolare Cystein durch ein ungeladen-polares Serin ersetzt.

Die 15 Mutationen auf DNA-Ebene sind nahezu gleichmäßig über das Gen verteilt, so dass regulatorische DNA-Elemente in diesem Leserahmen nicht zu vermuten sind.

```

1   ATGCTCGGGCTTCTGCTTCGTACCACTTTCACTGCCTGCTTCTGTGCGC UL130 AD169.SEQ
1   ATGCTACGGCTTCTGCTTCGTACCACTTTCACTGCCTGCTTCTGTGCGC UL130 40E.SEQ
1   ATGCTACGGCTTCTGCTTCGTACCACTTTCACTGCCTGCTTCTGTGCGC UL130 40F.SEQ

51  GGT'TTGGGCAACGCCCTGTCTGGCGTCTCCGTGGTCAACGCTAACGGCAA UL130 AD169.SEQ
51  GGT'TTGGGCAACGCCCTGTCTGGCGTCTCCGTGGTCAACGCTAACGGCGA UL130 40E.SEQ
51  GGT'TTGGGCAACGCCCTGTCTGGCGTCTCCGTGGTCAACGCTAACGGCGA UL130 40F.SEQ

101 ACCAGAATCCGTCCCCGCATGGTCTAAACTGACGTATTCCAAACCGCAT UL130 AD169.SEQ
101 ACCAGAATCCGTCCCCGCTATGGTCTAAACTGACGTATTCCAAACCGCAT UL130 40E.SEQ
101 ACCAGAATCCGTCCCCGCTATGGTCTAAACTGACGTATTCCAAACCGCAT UL130 40F.SEQ

151 GACGCGGCGACGTTTTACTGTCTTTTTCTCTATCCCTCGCCCCACGGTC UL130 AD169.SEQ
151 GACGCGGCGACGTTTTACTGTCTTTTTATCTATCCCTCGCCCCACGGTC UL130 40E.SEQ
151 GACGCGGCGACGTTTTACTGTCTTTTTATCTATCCCTCGCCCCACGGTC UL130 40F.SEQ

201 CCCCTTGCAATTCTCGGGGTTCAGCAGGTATCAACGGGTCCCGAGTGTC UL130 AD169.SEQ
201 CCCCTTGCAATTCTCGGGGTTCAGCAGGTATTAACGGGTCCCGAGTGTC UL130 40E.SEQ
201 CCCCTTGCAATTCTCGGGGTTCAGCAGGTATTAACGGGTCCCGAGTGTC UL130 40F.SEQ

251 GCAACGAGACCCTGTATCTGCTGTACAACCGGGAAGGCCAGACCTTGGTG UL130 AD169.SEQ
251 GCAACGAGACCCTGTATCTGCTGTACAACCGGGAAGGCCAGACCTTGGTG UL130 40E.SEQ
251 GCAACGAGACCCTGTATCTGCTGTACAACCGGGAAGGCCAGACCTTGGTG UL130 40F.SEQ

301 GAGAGAAGCTCCACCTGGGTGAAAAAGGTGATCTGGGATCTGAGCGGTCTG UL130 AD169.SEQ
301 GAGAGAAGCTCCACCTGGGTGAAAAAGGTGATCTGGGACCTGAGCGGTCTG UL130 40E.SEQ
301 GAGAGAAGCTCCACCTGGGTGAAAAAGGTGATCTGGGACCTGAGCGGTCTG UL130 40F.SEQ

351 CAACCAGACCATCCTCCAACGGATGCCCGAACGGCTTCAAACCGAGCG UL130 AD169.SEQ
351 CAACCAGACCATCCTCCAACGGATGCCCGAACGGCTTCAAACCGAGCG UL130 40E.SEQ
351 CAACCAGACCATCCTCCAACGGATGCCCGAACGGCTTCAAACCGAGCG UL130 40F.SEQ

401 ACGGAAACGTGCAGATCAGCGTGGAAAGACGCCAAGATTTTTGGAGCGCAC UL130 AD169.SEQ
401 ACGGAAACGTGCAGATCAGCGTGGAAAGACGCCAAGATTTTTGGAGCGCAC UL130 40E.SEQ
401 ACGGAAACGTGCAGATCAGCGTGGAAAGACGCCAAGATTTTTGGAGCGCAC UL130 40F.SEQ

451 ATGGTGCCCAAGCAGACCAAGCTGCTACGCTTCGTTCGTCACGATGGCAC UL130 AD169.SEQ
451 ATGGTGCCCAAGCAGACCAAGCTGCTACGCTTCGTTCGTCACGATGGCAC UL130 40E.SEQ
451 ATGGTGCCCAAGCAGACCAAGCTGCTACGCTTCGTTCGTCACGATGGCAC UL130 40F.SEQ

501 CGTTATCAGATGTGTGTGATGAAGCTGGAGAGCTGGGCTCACGTCTTCC UL130 AD169.SEQ
501 ACGTTATCAGATGTGTGTGATGAAGCTGGAGAGCTGGGCTCACGTCTTCC UL130 40E.SEQ
501 ACGTTATCAGATGTGTGTGATGAAGCTGGAGAGCTGGGCTCACGTCTTCC UL130 40F.SEQ

551 GGGACTACAGCGTGTCTTTTCAGGTGCGATTGACGTTACCGAGGCCAAT UL130 AD169.SEQ
551 GGGACTACAGCGTGTCTTTTCAGGTGCGATTGACGTTACCGAGGCCAAT UL130 40E.SEQ
551 GGGACTACAGCGTGTCTTTTCAGGTGCGATTGACGTTACCGAGGCCAAT UL130 40F.SEQ

601 AACCAGACTTACACCTTCTGTACCCATCCCAATCTCATCGTTTGA UL130 AD169.SEQ
601 AACCAGACTTACACCTTCTGTACCCATCCCAATCTCATCGTTTGA UL130 40E.SEQ
601 AACCAGACTTACACCTTCTGTACCCATCCCAATCTCATCGTTTGA UL130 40F.SEQ

```

Decoration 'Decoration #1': Shade (with solid light gray) residues that differ from UL130 AD169.SEQ.

Decoration 'Decoration #2': Shade (with solid black) residues that differ from UL130 40E.SEQ.

**Abb. 12: DNA-Sequenzvergleich der HCMV Stämme 40 E, 40F und AD169 im offenen Leserahmen UL130.** Rot unterlegt sind Unterschiede im Vergleich von HCMV 40E/F zu HCMV AD169. Schwarz unterlegt sind Unterschiede im Vergleich von HCMV 40E zu HCMV 40F und HCMV AD169.

```

1   MLRLLLRHHFHCLLLCAVWATPCLASPWSTLTANQNPSPLWSKLTYSKPH UL130 AD169.SEQ
1   MLRLLLRHHFHCLLLCAVWATPCLASPWSTLTANQNPSPLWSKLTYSKPH UL130 40E.SEQ
1   MLRLLLRHHFHCLLLCAVWATPCLASPWSTLTANQNPSPLWSKLTYSKPH UL130 40F.SEQ

151 DAATFYCPFIYPSPPRSPLQFSGFQVSTGPECRNETLYLLYNREGQTLV UL130 AD169.SEQ
151 DAATFYCPFIYPSPPRSPLQFSGFQVLTGPECRNETLYLLYNREGQTLV UL130 40E.SEQ
151 DAATFYCPFIYPSPPRSPLQFSGFQVLTGPECRNETLYLLYNREGQTLV UL130 40F.SEQ

301 ERSSTWVKKVIWHLSGRNQTILQRMPTASKPSDGNVQISVEDAKIFGAH UL130 AD169.SEQ
301 ERSSTWVKKVIWHLSGRNQTILQRMPTASKPSDGNVQISVEDAKIFGAH UL130 40E.SEQ
301 ERSSTWVKKVIWHLSGRNQTILQRMPTASKPSDGNVQISVEDAKIFGAH UL130 40F.SEQ

451 MVPKQTKLLRFVVDGTRYQMCVMKLESWAHVFRDYSVSFQVRLTFTEAN UL130 AD169.SEQ
451 MVPKQTKLLRFVVDGTRYQMCVMKLESWAHVFRDYSVSFQVRLTFTEAN UL130 40E.SEQ
451 MVPKQTKLLRFVVDGTRYQMCVMKLESWAHVFRDYSVSFQVRLTFTEAN UL130 40F.SEQ

601 NQTYTFCTHPNLIV. UL130 AD169.SEQ
601 NQTYTFCTHPNLIV. UL130 40E.SEQ
601 NQTYTFCTHPNLIV. UL130 40F.SEQ

```

Decoration 'Decoration #1': Shade (with solid light gray) residues that differ from UL130 AD169.SEQ.

Decoration 'Decoration #2': Shade (with solid black) residues that differ from UL130 40E.SEQ.

**Abb. 13: Aminosäuresequenzvergleich der HCMV Stämme 40 E, 40F und AD169 im offenen Leserahmen UL130.** Rot unterlegt sind Unterschiede im Vergleich von HCMV 40E/F zu HCMV AD169. Schwarz unterlegt sind Unterschiede im Vergleich von HCMV 40E zu HCMV 40F und HCMV AD169.

Der offene Leserahmen UL131A (Abb. 9) umfasst in der kürzlich anhand klinischer HCMV-Isolate neu definierten Sequenz 499 Basenpaare. Von diesem Leserahmen wird eine RNA transkribiert in der zwei kodierende Exonbereiche von einem nichtkodierenden Intronbereich unterbrochen werden. Die gespleißte mRNA kodiert für ein Protein von 129 Aminosäuren. Die Basensequenz war zwischen dem Stamm AD169 einerseits und den Stämmen 40E und 40F andererseits zu 97,8 % konserviert, die Stämme 40E und 40F unterschieden sich durch eine einzige stumme Mutation (Anhang 5), so dass die beiden Stämme auf der Proteinebene sequenzidentisch sind (Anhang 6). AD169 weist gegenüber den Stämmen 40E/F zunächst zwei stumme Mutationen an den



Positionen 69 und 75 auf. Ein zusätzliches Adenin innerhalb einer Poly-A-Strecke bewirkt aufgrund der resultierenden Leserasterverschiebung ab Aminosäure 28 dann jedoch eine komplett veränderte Aminosäuresequenz und durch ein vorzeitiges Stoppcodon ein Trunkierung des Proteins nach Aminosäure 74, während das Wildtypprotein der Stämme 40E und 40F insgesamt 129 Aminosäuren umfasst. Eine Erklärung für die Unterschiede im Zelltropismus kann dieser Leserahmen aufgrund der Aminosäuresequenz-Identität zwischen 40E und 40F jedoch nicht liefern.

Insgesamt weist die Region UL128-131A verglichen mit den vorher besprochenen Genen eine etwa doppelt so hohe Sequenzvariabilität im Vergleich zwischen AD169 und 40E/F auf. Auch zwischen den Stämmen 40E und 40F gibt es in allen drei Genen einen Polymorphismus auf DNA-Ebene. Auf Proteinebene kann jedoch nur in UL128 eine Veränderung der Aminosäuresequenz gefunden werden, welche die phänotypischen Unterschiede im Zelltropismus der beiden Stämme erklären könnte.

#### **4.4 Zusammenfassende Darstellung der Sequenzvariabilität zwischen dem Laborstamm HCMV AD169 und dem Isolatpaar HCMV 40E und HCMV 40F.**

Die Analyse der genetischen Determinanten bestimmter phänotypischer Eigenschaften von HCMV-Stämmen ist erschwert durch den ausgeprägten *a priori* vorhandenen genetischen Polymorphismus. Aufgrund des mit 230.000 Basenpaaren sehr umfangreichen HCMV-Genoms konnte vermutet werden, dass zwei unabhängig voneinander gewonnene HCMV-Isolate zahlreiche über das Genom verteilte Unterschiede in ihrer DNA-Sequenz aufweisen. Auf diesem Hintergrund wäre die Zuordnung einzelner Sequenzunterschiede zu Unterschieden ihrer Eigenschaften, wie beispielsweise im Zelltropismus, nahezu unmöglich. Ein Weg zur Lösung dieses Problems wurde in der vorliegenden Arbeit getestet, nämlich die vergleichende Analyse phänotypisch

unterschiedlicher HCMV-Varianten, die genetisch so eng verwandt sind, dass der *a priori* Gen-Polymorphismus so gering wie möglich ist

Die beiden untersuchten HCMV-Stämme 40E und 40F stammen nicht nur aus der gleichen Patientenprobe - selbst unter den genetischen Varianten eines Patienten findet sich noch ein erheblicher *a priori* Polymorphismus - sondern wurden aus einem genetisch homogenen plaquegereinigten Viruspräparat aufgrund ihrer Unterschiede im Endothelzelltropismus selektioniert. Die Annahme war, dass diese beiden HCMV-Stämme nur wenige genetische Unterschiede aufweisen und diese deshalb mit einer größeren Wahrscheinlichkeit den phänotypischen Unterschied im Endothelzelltropismus determinieren.

Die vergleichende Sequenzanalyse ausgewählter Gene von HCMV 40E, HCMV 40F und dem Standard-Laborstamm AD169 bestätigte (1) die Vermutung eines sehr ausgeprägten genetischen Polymorphismus zwischen unabhängigen HCMV-Stämmen und (2) die Grundannahme dieses Projektes, dass dieser Polymorphismus weitgehend ausgeschaltet werden kann durch die Verwendung sehr eng verwandter HCMV-Varianten.

Insgesamt wurden 6 offene Leserahmen mit ca. 12.700 Basenpaaren untersucht, was etwa 5,5% des gesamten viralen Genoms entspricht. In den untersuchten Leserahmen wies der endotheliotrope Stamm 40E gegenüber dem nichtendotheliotropen Laborstamm AD169 insgesamt 181 Basenaustausche auf, was einer Mutationsfrequenz von 1,43% entspricht. Verglichen mit dem nichtendotheliotropen Stamm 40F wies der endotheliotrope Stamm 40E hingegen nur 5 Mutationen auf, was einer Mutationsfrequenz von 0,04% entspricht.

Die Anzahl der zu beachtenden Mutationen auf DNA-Ebene wurde um über 97% von 181 auf 5 gesenkt.

**Tab. 1:** Frequenz von Basenaustauschen zwischen den HCMV-Stämmen 40E und 40F beziehungsweise 40E und AD169 in den untersuchten Leserahmen.

Offener Leserahmen	Basenpaare gesamt	Basenaustausche zwischen 40E und 40F	Basenaustausche zwischen 40E und AD169
UL24	903	0	6
UL48	6726	0	86
UL32	3150	1	43
UL128	758	2	21
UL130	645	1	14
UL131A	499	1	11
Summe	12.681	5	181

In der Analyse, wie sich diese Mutationen auf der Proteinebene auswirken, erwies sich die Reduktion des *a priori* Polymorphismus als besonders vorteilhaft. Eine Bedeutung der Leserahmen UL24, UL48, UL130 und UL131A an der Ausprägung des Zelltropismusunterschiedes zwischen HCMV 40E und 40F kann als nahezu ausgeschlossen gelten, da die Proteine entweder sequenzidentisch sind oder - im Falle von UL130 - der gefundene Unterschied bedeutungslos ist, da der endotheliotrope Stamm 40E hier dem nichtendotheliotropen Stamm AD169 entspricht. Während also bei einem Vergleich der Stämme 40E und AD169 alle sechs Leserahmen als potenzielle Determinanten des Endothelzelltropismus gelten müssten wurde durch den Vergleich mit dem eng verwandten Stamm 40F die Zahl der in Frage kommenden Leserahmen auf zwei eingeschränkt.

**Tab. 2:** Frequenz von Aminosäureaustauschen zwischen den HCMV-Stämmen 40E und 40F beziehungsweise 40E und AD169 in den untersuchten Leserahmen.

Offener Leserahmen	Aminosäuren gesamt	Aminosäuren-Unterschiede zwischen 40E und 40F	Aminosäuren-Unterschiede zwischen 40E und AD169
UL24	300	0	2
UL48	2241	0	15
UL32	1048	1	14
UL128	171	26	29
UL130	214	1	7
UL131A	129	0	55
Summe	4103	28	122

Aufgrund des klaren Unterschiedes im Endothelzelltropismus dieser beiden Stämme und ihres nahezu identisch scheinenden Genoms, bietet das Isolatpaar 40E und 40F eine gute Basis, um genetische Ursachen für Unterschiede im Zelltropismus zu untersuchen.

## 5 Diskussion

Der Endothelzelltropismus von Stammvarianten des humanen Cytomegalovirus (HCMV) ist ein möglicher Virulenzfaktor, durch den möglicherweise der klinische Verlauf der Infektion mit HCMV mitbestimmt wird (Grefte et al., 1995). Eine akute HCMV-Infektion kann von einer klinisch inapparenten selbstlimitierenden Reaktivierungen, über klinische Manifestation bis hin zu letalen therapieresistenten Verläufen reichen.

Jim Waldman hatte 1989 erstmals Zelltropismusvarianten mit ausgeprägter Stammvariabilität beschrieben, und gezeigt, dass - im Gegensatz zu den bis dahin verwendeten fibroblasten-adaptierten HCMV-Stämmen - eine endothelzell-propagierte HCMV-Variante eine deutliche Zytotoxizität in Endothelzellkulturen aufwies (Waldman et al., 1991). Solche endothelzell-propagierten Stämme zeigten auch einen Tropismus für Makrophagen und dendritische Zellen, der allen nichtendotheliotropen Varianten fehlte (Jahn et al., 1999; Riegler et al., 2000). Interessanterweise spielen genau diese Zellen eine zentrale Rolle in der Pathogenese von HCMV, da sie für die hämatogene Ausbreitung des Virus bedeutsam sind. Eine Hypothese, die sich daraus ergibt wäre, dass Stämme ohne Endothelzell- und Makrophagen-Tropismus eine deutlich geringere Fähigkeit zur Ausbreitung, und damit eine geringere Virulenz im Sinne von Manifestation in anderen Organen unabhängig vom primären Replikationsort hätten.

Bestimmt wird der Endothelzelltropismus von HCMV-Varianten vermutlich durch das Zusammenspiel von viralen Tegument- und Hüllproteinen mit den zellulären Transportmechanismen, wobei hier das Mikrotubulus-System und der Dyneinkomplex eine besondere Rolle spielen. Welche viralen Proteine bei einzelnen HCMV-Varianten tatsächlich die Unterschiede im Zelltropismus determinieren ist bislang ungeklärt.

Ein wesentliches Ergebnis dieser Arbeit ist, dass die in UL24 und UL48 kodierten Proteine im untersuchten Isolatpaar HCMV 40E/F aufgrund der

Sequenzgleichheit als Ursache für den unterschiedlichen Zelltropismus dieser beiden Stämme ausgeschlossen werden können. Im Leserahmen UL32 hingegen wurde ein Unterschied in der Basensequenz gefunden, welcher sich auch auf die Aminosäuresequenz auswirkt. Dieser könnte möglicherweise für den unterschiedlichen Zelltropismus der beiden Stämme mitverantwortlich sein. Auch in der Genregion UL128-131A, die bei einem anderen HCMV-Stamm als Tropismusedeterminante beschrieben worden war (Hahn et al., 1998), wiesen HCMV 40E und HCMV 40F Polymorphismen auf, die im Bereich des UL128-Genes mit einer Rolle für die beobachteten Zelltropismusunterschiede vereinbar sind.

### ***5.1 Die mögliche Rolle der Tegumentproteine UL24, UL48 und UL32 für den Endothelzelltropismus von HCMV***

Die mögliche Bedeutung von Tegumentproteinen für phänotypische Zelltropismus-Unterschiede zwischen einzelnen HCMV-Stämmen ergibt sich aus der zeitlichen Lokalisation der Blockierung nichtendotheliotroper HCMV-Stämme im Verlauf des viralen Replikationszyklus. Die Tatsache, dass endotheliotrope und nichtendotheliotrope HCMV-Stämme zwar beide in Endothelzellen penetrieren können, dass jedoch nur endotheliotrope Stämme in der Zelle zum Kern transportiert werden, hat zur Folge, dass bei nichtendotheliotropen Stämmen schon die DNA-Freisetzung aus dem Viruskapsid misslingt und deshalb überhaupt keine Genexpression zustande kommt. Dies bedeutet, dass zu diesem Phänotyp nur solche Proteine beitragen können, die Bestandteile des Viruspartikels sind, also Kapsidproteine, Tegumentproteine und Hüllproteine.

Da der Mikrotubulus-vermittelte intrazelluläre Transport von Herpesviren offensichtlich durch Interaktion nackter Viruskapside mit dem Dyneinkomplex erfolgt, sind Hüllproteine nicht vorrangige Kandidaten. Die Interaktion mit dem Zytoskelett sollte eher durch solche Tegumentproteine erfolgen, die nach dem Entry am Kapsid verbleiben oder durch Kapsidproteine selbst.

Insbesondere die Proteine, die durch die viralen Leserahmen UL24, UL32 und UL48 kodiert werden, kommen hierfür in Frage. UL32 und UL48 wurden als mögliche Komponenten einer elektronenmikroskopisch nachweisbaren Tegumentschicht benannt, die das Kapsid vollständig überzieht. Für UL24 wurde gezeigt, dass eine Deletion dieses Gens zu einer Reduktion des Endothelzelltropismus führt. Unklar war jedoch ob dieses Gen auch einen natürlichen Polymorphismus aufweist, der das Auftreten natürlicher Zelltropismusvarianten von HCMV erklären könnte.

Der Sequenzvergleich der HCMV-Stämme 40E und 40F in der vorliegenden Arbeit spricht gegen eine solche Annahme. Der endotheliotrope Stamm 40E und der nichtendotheliotrope Stamm 40F waren auf DNA-Ebene sequenzidentisch, was bei beiden Stämmen zu identischen Proteinen führen würde. Auch im Vergleich zur publizierten Sequenz des Laborstammes AD169 wies dieses Gen den geringsten Polymorphismus auf. Die Literaturberichte über die Reduktion des Endothelzelltropismus nach Deletion von UL24 weisen zwar auf eine Beteiligung dieses Gens bei der Infektion von Endothelzellen hin, der Phänotypunterschied bei den natürlich vorkommenden HCMV-Varianten 40E und 40F ist jedoch nicht auf dieses Gen zurückzuführen.

Auch für den Leserahmen UL48 wurde in der vorliegenden Arbeit eine völlige Übereinstimmung der beiden HCMV-Stämme auf DNA-Ebene gefunden, so dass auch hier ein Unterschied auf Proteinebene ausgeschlossen ist. Diese Sequenzidentität in einem 6726 Basenpaare umfassenden Leserahmen ist umso bemerkenswerter, als im Vergleich zur publizierten AD169-Sequenz ein durchaus nennenswerter Polymorphismus besteht, der immerhin zu 15 Unterschieden in der Aminosäuresequenz des UL48-Proteines zwischen HCMV 40E/F einerseits und AD169 andererseits führt. Interessanterweise sparen die Mutationen sowohl auf Proteinebene als auch auf DNA-Ebene einen zentralen Bereich des Gens völlig aus (Anhang 3). Dies lässt vermuten, dass sich dort wichtige regulatorische Nukleinsäureelemente befinden, die auch stumme Mutationen nicht erlauben. Ob sich die Unterschiede zwischen HCMV 40E/F und HCMV AD169 auf die Replikation des Virus auswirken ist derzeit völlig

offen, da über die Funktion dieses Proteins nichts bekannt ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen aber eindeutig, dass dieser Leserahmen nicht zum Zelltropismusunterschied zwischen 40E und 40F beiträgt.

Es besteht allenfalls die Möglichkeit, dass das UL48-Protein indirekt durch Interaktion mit einem anderen Protein am Zustandekommen des Phänotyps beteiligt ist. Ein Kandidat hierfür wäre das UL47-Protein. UL47 kodiert ebenfalls für ein Tegumentprotein. Bechtel und Shenk ordneten 2002 diesem Protein eine Regulationsfunktion auf das in UL48 kodierte Tegumentprotein zu. Somit könnte UL47 also sowohl in seiner Eigenschaft als Tegumentprotein als auch durch seine Regulationsfunktion auf UL48 den Zelltropismus beeinflussen (Bechtel & Shenk, 2002). Eine Mutation in diesem Bereich könnte zu einer veränderten Expression des in UL48 kodierten Tegumentproteins führen und somit eventuell zu einer gestörten Interaktion zwischen viralem Bindungspartner und dem Dyneinkomplex der Wirtszelle führen. Eine weitere Möglichkeit für die Ursache des unterschiedlichen Zelltropismus zwischen HCMV 40E und HCMV 40F wäre eine gestörte Interaktion von zellulärem Bindungspartner mit dem UL47 selbst. Bei vergleichender Sequenzanalyse in der Arbeitsgruppe (persönliche Korrespondenz: Lempp, J.) stellte man in UL47 ebenfalls eine Sequenzidentität im Isolatpaar HCMV 40E/F fest. Somit hatte im Isoatpaar HCMV 40E/F weder das durch UL48, noch das durch UL47 kodierte Tegumentprotein einen Einfluss auf den Unterschied im Zelltropismus.

Im Gegensatz zu den vorgenannten Genen wurde im Leserahmen UL32 ein DNA-Sequenzunterschied zwischen 40E und 40F gefunden, der sich auch auf der Aminosäure-Ebene auswirkt. An Position 308 des Proteins weist der endotheliotrope Stamm 40E ein Phenylalanin auf, während die nichtendotheliotropen Stämme 40E und AD169 an dieser Stelle beide ein Leucin aufweisen. Dies ist eine konservative Mutation, da beide Aminosäuren unpolare Seitenketten haben. Eine Änderung in der Funktion des Proteins ist von daher eher unwahrscheinlich, aber denkbar und sollte in weiterführenden Untersuchungen funktionell geprüft werden. Denn von seiner Lokalisation her als kapsidassoziiertes Tegumentprotein ist das UL32-Protein prädestiniert für



eine Interaktion mit dem Dyneinmotorkomplex der Zelle. Das auch als „basic phosphoprotein“ (BPP) oder pp150 bekannte Protein wurde von Gibson et al. als eines der drei Hauptkandidaten benannt, die in ausreichend hoher Quantität vorhanden sind (Baldick & Shenk, 1996; Gibson, 1996). Es ist, im Gegensatz zu den anderen beiden Kandidaten, am engsten mit dem Kapsid assoziiert und weist somit eine sehr hohe Bindungskraft zum Kapsid auf (Baxter & Gibson, 2001; Gibson, 1996; Landini et al., 1987). BPP blieb auch noch nachweisbar, als alle anderen Tegumentproteine durch Behandlung mit Detergenzien bereits abgelöst waren (Gibson, 1996). Da es sich um ein eng mit dem Kapsid assoziiertes Tegumentprotein handelt, ist es mit hoher Wahrscheinlichkeit einer der viralen Bindungspartner für zelluläre Transportstrukturen. Diese Annahme wurde durch die Arbeit von Chen et al., 1999 unterstützt. Hier konnte durch elektronenmikroskopische Daten gezeigt werden, dass Tegumentstrukturen in einer ikosaedrischen Anordnung kovalent mit dem Hauptkapsidprotein verknüpft sind (Chen et al., 1999). Die Oberfläche der Nukleokapside wird im Wesentlichen durch diese Struktur gebildet, für welche pp150 als Hauptkandidat benannt wurde. Demnach wäre pp150 das exponierte Virusprotein für eine Interaktion mit dem Zytoskelett. Die wahrscheinlichste Ursache der ineffizienten Vermehrung der nichtendotheliotropen HCMV-Stämme in Endothelzellen ist der ineffiziente Transport des Virus von der Peripherie der Wirtszelle zum Zellkern (Sinzger et al., 2000).

Da Viren selbst keine Bewegung erzeugen können, sind sie in der Zelle auf zelluläre Transportmechanismen angewiesen, um zum Zellkern zu gelangen. Daher ist die Interaktion der Viren mit den zellulären Transportmechanismen ein wichtiger Faktor für die Ausprägung des Zelltropismus von HCMV. Intrazelluläre Transportvorgänge werden durch Bestandteile des Zytoskeletts, insbesondere des Mikrotubulussystems, vermittelt. Das Mikrotubulussystem ist auf der Seite der Zelle mit dem Dynein/Dynaktin-Komplex an den Transportvorgängen von der Zellperipherie zum Zellkern beteiligt (Hirokawa, 1998a; Hirokawa et al., 1998).

Dass Dynein an der Vermittlung von viralen Infektionen beteiligt ist, wurde u.a. von Sodeik 1997 beobachtet. Diese Arbeit untersuchte, wie das HSV Typ 1 in kultivierten Zellen transportiert wird. Dabei wurde festgestellt, dass der Transport der viralen Kapside zum Zellkern von einem intakten Mikrotubulussystem abhängt, und dass das zytoplasmatische Dynein eng an die viralen Kapside assoziiert ist (Sodeik et al., 1997).

Der Dyneinkomplex, der wahrscheinlich auch für den Transport des HCMV-Partikels zum Zellkern verantwortlich ist, besteht aus mehreren Untereinheiten und ist eng mit dem Proteinkomplex Dynaktin verbunden (Hirokawa, 1998a; Hirokawa et al., 1998; Karki & Holzbaur, 1999).

Die Interaktion zwischen den Viruspartikeln und dem Dyneinkomplex auf zellulärer Seite wird durch entsprechende Proteine auf beiden Seiten vermittelt. Diese könnten zu den beschriebenen Zelltropismusunterschieden beitragen. Auf viraler Seite sind dies in erster Linie die Strukturproteine, die die Unterschiede im Partikel determinieren. Diese viralen Bindungspartner sind die Tegumentproteine und das Kapsid. In einer Arbeit von Chen et al. wurde in einer dreidimensionalen Darstellung des Kapsidproteins gezeigt, dass dieses weitgehend von Tegument bedeckt bzw. maskiert wird (Chen et al., 1999). Untersuchungen von Sinzger et al. zeigten, dass eine Anfärbung von Partikeln mit Antikörpern gegen das Hauptkapsidprotein, welches ein möglicher Bindungspartner auf viraler Seite sein könnte, nicht möglich war (Sinzger et al., 2000). So war davon auszugehen, dass das Kapsid durch Tegument maskiert wird und somit als Bindungspartner nicht zur Verfügung stehen kann. Auch in anderen Viren der Herpesfamilie wurden die Tegumentproteine als Bindungspartner beim Kerntransport beschrieben (Ye et al., 2000). Sieht man also pUL32 als viralen Bindungspartner für das zelluläre Transportsystem, so könnte eine Mutation zu einem viralen Bindungspartner mit unterschiedlicher Affinität zum zellulären Transportsystem führen. Diese unterschiedliche Affinität hat möglicherweise auf die Effizienz des Transports von viraler DNA zum Zellkern Einfluss. Diese könnte somit die unterschiedliche Infektionseffizienz verschiedener Virusstämme begründen.

## **5.2 Die mögliche Rolle der Genregion UL128-131 für den Endothelzelltropismus von HCMV**

Vor kurzem erschienen Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, die auf eine Beteiligung der Genregion UL128-131A an der Ausprägung des Endothelzelltropismus hinwiesen (Dunn et al., 2003; Hahn et al., 2004). Auf dem genetischen Hintergrund eines klinischen HCMV-Isolates führten Deletionen in den Leserahmen UL128, UL130 und UL131A jeweils zu einem verminderten Endothelzelltropismus bei erhaltenem Fibroblastotropismus. Wie bei UL24 war auch hier unklar, ob die natürlich entstandenen HCMV-Varianten 40E und 40F in dieser Region einen Polymorphismus aufweisen, der die Unterschiede im Zelltropismus dieser Stämme bedingt. Anders als bei UL24 gab es in dieser Region immerhin Hinweise auf einen ausgedehnten genetischen Polymorphismus bei einer Reihe von HCMV-Stämmen, der sich auf das Proteinexpressionsmuster auswirkt.

Die Überprüfung dieser Genregion an dem HCMV-Stammpaar 40E und 40F bestätigte einen ausgeprägten genetischen Polymorphismus in dieser Region. Mit einem Konservierungsgrad von 97,2% in UL128, 97,7% in UL130 und 97,8% in UL131A zwischen HCMV 40E/F einerseits und HCMV AD169 andererseits war die genetische Stabilität aller drei Leserahmen weitaus geringer als bei den zuvor analysierten Leserahmen UL24, UL32 und UL48. Konsistent mit einer insgesamt erhöhten Variabilität der UL128-131A-Region fanden sich in allen drei Leserahmen auch Unterschiede zwischen dem endotheliotropen Stamm 40E und dem nichtendotheliotropen Stamm 40F. Während ein einzelner Basenaustausch in UL131A sich nicht auf Aminosäureebene auswirkte, führte ein Basenaustausch in UL130 zu einem Aminosäureaustausch eines unpolaren Cysteins bei HCMV 40E durch ein polares Serin bei HCMV 40F an Position 207. Allerdings ist dieser Unterschied nicht geeignet die unterschiedliche Eigenschaft im Endothelzelltropismus zu erklären, denn der nichtendotheliotrope Stamm AD169 hat an dieser Stelle wie der endotheliotrope Stamm 40E ein Cystein.

Bedeutsamer könnte der Stammunterschied im Leserahmen UL128 sein. HCMV 40E unterscheidet sich auf DNA-Ebene von HCMV 40F zwar nur durch eine Deletion von 2 Basen an Position 645/646, dies hat aber eine dramatische Änderung des C-terminalen Proteinabschnittes zur Folge, da sich das Leseraster verschiebt. Der nichtendotheliotrope Stamm HCMV 40F entspricht in seiner Aminosäuresequenz dem nichtendotheliotropen Stamm AD169, während beim endotheliotropen Stamm 40E die letzten 19 Aminosäuren fehlen und weitere 17 Aminosäuren verändert sind. Auf dem Hintergrund einer sehr weitgehenden Sequenzidentität der beiden Stämme 40E und 40F hat eine solche Mutation durchaus Gewicht. In Zusammenschau mit den Literaturdaten über eine Reduktion des Endothelzelltropismus nach Deletion des UL128-Leserahmens im Genom eines klinischen HCMV-Isolates ergibt sich folgende Hypothese: im C-terminalen Abschnitt des UL128-Proteins von HCMV 40E ist eine für den Endothelzelltropismus bedeutsame Funktion repräsentiert. Wird diese Funktion durch einen "Frameshift" oder durch eine Deletion des gesamten Gens zerstört, so ist eine effiziente Infektion von Endothelzellen nicht mehr möglich. Ob diese Hypothese zutrifft, werden zukünftige funktionelle Analysen der unterschiedlichen UL128-Varianten erweisen.

### ***5.3 Die Eignung des HCMV-Stammpaares 40E/F als Modellsystem für die Genotypanalyse des Endothelzelltropismus von HCMV***

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die HCMV-Stämme 40E und 40F mit unterschiedlichem Zelltropismus in ihrem Genom zu vergleichen. Prinzipiell erlaubt eine vergleichende Genomanalyse zweier Virusstämme mit unterschiedlichem Zelltropismus die Definition von Genen, die zum Phänotyp beitragen. Das ungewöhnlich große Genom von HCMV mit 230.000 Basenpaaren erschwert jedoch die Suche nach Genen, die für den Endothelzelltropismus von Bedeutung sein könnten und ist für einen direkten Vergleich der Genome durch Sequenzierung zu groß. Ein weiteres Problem ist,

dass bei zwei beliebig gewählten HCMV-Stämmen der genetische Polymorphismus sehr ausgeprägt ist, d.h. in einem Vergleich der Sequenzen zeigen sich eine große Anzahl von Genomunterschieden in unterschiedlichen Genomregionen, womit der direkte Schluss auf einen bestimmten Phänotyp nicht gezogen werden kann.

Selbst HCMV-Stämme, die sich in ihrem Phänotyp sehr ähnlich sind, zeigen in ihrem Restriktionsmuster noch zahlreiche Unterschiede (Sinzger et al., 1999). Bei der Auswahl der zu untersuchenden Stämme kam es darauf an, diese möglichst so auszuwählen, dass sie einen möglichst geringen genetischen Polymorphismus aufweisen, und dass sie sich phänotypisch in ihrem Endothelzelltropismus unterscheiden. Treffen diese beiden Eigenschaften zu, so ist es nahe liegend, dass die Unterschiede, die im Restriktionsmuster auftreten, für den Zelltropismus von Bedeutung sind.

Aus diesem Grund wurde in der hier vorliegenden Arbeit ein Isolatpaar gewählt, welches von einem gemeinsamen Ursprungsisolat, genannt TB40, eines infizierten Patienten ausgeht.

Dieses Patientenisolat wurde zunächst parallel über 22 Passagen auf humanen Hautfibroblasten (HFF) und humanen Endothelzellen der Umbilikalvene (HUVEC) propagiert. Nach der 22. Passage erfolgte jeweils eine Plaquereinigung und das generierte Isolatpaar wurde mit TB40/E (endothelzellpropagiert) und TB40/F (fibroblastenpropagiert) bezeichnet. Die vergleichende Restriktionsfragment-Längenanalyse (RFLA) zeigte bei dem so entstandenen Paar multiple Genomunterschiede, die über das gesamte Genom verteilt lagen (Sinzger et al., 1999). Ein Genomvergleich dieses Stammpaares im Hinblick auf den Endothelzelltropismus hätte also noch keinen Sinn ergeben.

Aus diesem Grund wurden genetisch noch enger verwandte Stämme generiert. Das plaque-gereinigte Virus TB40/E wurde wieder zurück auf HFF adaptiert, um so eine nichtendotheliotrope Variante von TB40/E zu erhalten, die durch einzelne Mutationen während der Rückadaptation entstehen würde. Nach einem Selektionszeitraum von über einem Jahr hatte die Mehrheitspopulation in

der rückadaptierten Viruspopulation ihren Endothelzelltropismus verloren, während eine Minderheitenpopulation noch den ursprünglichen Endothelzelltropismus zeigte. Durch dreifache Plaquereinigung wurden genetische homogene quasi klonale Virusvarianten 40E und 40F gewonnen, von denen erstere endotheliotrop und letztere nichtendotheliotrop war. Von diesem Isolatpaar war anzunehmen, dass das Genom der beiden Stämme abgesehen von dem oder den entscheidenden, für den Unterschied im Zelltropismus verantwortlichen Genomabschnitt sehr ähnlich sei.

Dies wurde durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt. Auf ca 12.700 Basen fanden sich im Vergleich zwischen den beiden Stämmen nur 5 Unterschiede, was einer Übereinstimmung von 99,96 % entspricht.

Auf Ebene der Aminosäuren zeigen drei der untersuchten Gene (UL24, UL48 und UL131A) eine 100%ige Identität und zwei weitere Genen jeweils einen einzigen Aminosäureaustausch (UL32 und UL130). Bei einem Gen (UL128) hatte jedoch die Deletion von zwei Basen eine Leserasterverschiebung und somit eine weitgehende Änderung der Aminosäuresequenz zur Folge. Gerade vor dem Hintergrund der großen Übereinstimmung auf DNA-Ebene gewinnt diese Mutation ein großes Gewicht. Somit hat sich das Isolatpaar HCMV 40E und HCMV 40F als ein geeignetes Zell-Virus-System, um Unterschiede im Zelltropismus bei HCMV näher zu untersuchen.

In Zusammenfassung ergaben die Sequenzvergleiche im Rahmen dieser Arbeit folgendes Bild: Es wurden zahlreiche Unterschiede im Vergleich zwischen dem Laborstamm AD169 und dem untersuchten Isolatpaar HCMV 40E/F gefunden, welche die Annahme eines hohen genetischen *a priori*-Polymorphismus bei HCMV bestätigen. Die sehr eng verwandten HCMV-Stämme HCMV 40E und HCMV 40F zeigen im Gegensatz dazu eine weitgehende Übereinstimmung. Nur in zwei der sechs untersuchten Gene waren Änderungen der Aminosäuresequenz nachweisbar, die geeignet sind, die Unterschiede im Endothelzelltropismus zu erklären.

Der in UL32 gefundene Unterschied in Form eines Austausches einer Base bei HCMV 40E, die auch zur Änderung der Aminosäuresequenz führt, sollte nun funktionell genauer untersucht werden. Insbesondere könnte das in dieser Arbeit klonierte UL32-Gen für Marker-Transfer-Experimente eingesetzt werden um zu prüfen, ob mit einem Gentransfer dieser Sequenz der Phänotyp eines Endothelzelltropismus auf einen nichtendotheliotropen Stamm übertragen werden kann. So ließe sich die funktionelle Relevanz dieses Unterschiedes überprüfen.

In gleicher Weise könnte auch für UL128 verfahren werden. Eine Klonierung dieses Genabschnittes und ein entsprechender Gentransfer sollte die Frage beantworten, ob dieses Gen für die Phänotypunterschiede bei natürlich entstandenen HCMV-Zelltropismusvarianten entscheidend ist.

## 6 Zusammenfassung

Stämme des menschlichen Cytomegalovirus (HCMV) zeigen genetisch determinierte Unterschiede im Zelltropismus. Auch Veränderungen im Zelltropismus im Rahmen der Zellkulturadaptation von HCMV-Stämmen sind mit Veränderungen der DNA assoziiert. Der entscheidende Schritt im Replikationszyklus ist hierbei, mit welcher Effizienz die Viruspartikel von HCMV-Stämmen nach der Penetration zum Zellkern transportiert werden. Der Phänotyp wird demnach durch Strukturproteine vermittelt, also Kapsidproteine, durch kapsidassoziierte Tegumentproteine oder Hüllproteine.

In dieser Arbeit wurden Tegumentproteine, die durch die viralen Leserahmen UL24, UL32, UL48 und UL128-131A von HCMV-Stämmen mit unterschiedlichem Zelltropismus durch Sequenzierung verglichen, um so Informationen über ihre mögliche Bedeutung für den Zelltropismus von HCMV zu erhalten.

Eine weitere wesentliche Aufgabe in dieser Arbeit war geeignete Stämme für den Sequenzvergleich auszuwählen. Es ist bekannt, dass ein direkter Sequenzvergleich zweier beliebiger HCMV-Stämme eine Vielzahl von Unterschieden in nahezu jedem untersuchten Gen aufweist, ohne dass diese für den Phänotyp bedeutsam wären. Daher wurden für diese Arbeit HCMV-Varianten gewählt, welche einen unterschiedlichen Phänotyp aufweisen und genetisch so eng verwandt sind, dass der *a priori* Gen-Polymorphismus so gering wie möglich ist. So stammen die untersuchten Stämme 40E und 40F nicht nur aus einem Patientenisolat, sondern wurden aus einem genetisch homogenen plaquegereinigten Viruspräparat aufgrund ihrer Unterschiede im Endothelzelltropismus selektioniert.

Ein wesentliches Ergebnis dieser Arbeit ist, dass die in UL24 und UL48 kodierten Proteine im untersuchten Isolatpaar HCMV 40E/F aufgrund der Sequenzgleichheit als Ursache für den unterschiedlichen Zelltropismus dieser beiden Stämme ausgeschlossen werden können. Im Leserahmen UL32



hingegen wurde ein Unterschied in der Basensequenz gefunden, welcher möglicherweise für den unterschiedlichen Zelltropismus der beiden Stämme mitverantwortlich sein könnte. Auch in der Genregion UL128-131A wiesen HCMV 40E und HCMV 40F Polymorphismen auf, die im Bereich des UL128-Genes mit einer Rolle für die beobachteten Zelltropismusunterschiede vereinbar sind. Mit einem Konservierungsgrad von 97,2% in UL128, 97,7% in UL130 und 97,8% in UL131A zwischen HCMV 40E/F einerseits und HCMV AD169 andererseits war die genetische Stabilität aller drei Leserahmen weitaus geringer als bei den zuvor analysierten Leserahmen UL24, UL32 und UL48. Während ein einzelner Basenaustausch in UL131A sich nicht auf Aminosäureebene auswirkte, führt ein Basenaustausch in UL130 zu einem Aminosäureaustausch eines unpolaren Cysteins bei HCMV 40E durch ein polares Serin bei HCMV 40F an Position 207. Dies ist aber nicht geeignet den Unterschied im Zelltropismus zu erklären, denn der nichtendotheliotrope Stamm AD169 hat an dieser Stelle wie der endotheliotrope Stamm 40E ein Cystein. Anders im Leserahmen UL128: HCMV 40E unterscheidet sich auf DNA-Ebene von HCMV 40F nur durch eine Deletion von 2 Basen. Dies hat aber eine dramatische Änderung des C-terminalen Proteinabschnitts zur Folge, da sich das Leseraster verschiebt. Somit entsprechen sich hier die nichtendotheliotrope Stämme HCMV 40F und AD169, während beim endotheliotropen Stamm HCMV 40E die letzten 19 Aminosäuren fehlen und weitere 17 Aminosäuren verändert sind. Damit scheint im C-terminale Abschnitt des UL128-Proteins von HCMV 40E eine für den Endothelzelltropismus bedeutsame Funktion repräsentiert zu werden.

Insgesamt wurden in dieser Arbeit zahlreiche Unterschiede im Vergleich zwischen dem Laborstamm AD169 und dem untersuchten Isolatpaar HCMV 40E/F gefunden, die die Annahme eines hohen genetischen *a priori*-Polymorphismus bei HCMV bestätigen. Die sehr eng verwandten HCMV-Stämme HCMV 40E und HCMV 40F zeigen im Gegensatz dazu eine weitgehende Übereinstimmung. Nur in zwei der sechs untersuchten Gene waren Änderungen der Aminosäuresequenz nachweisbar, die geeignet sind, die Unterschiede im Endothelzelltropismus zu erklären. Aufgrund dieser

Ergebnisse hat sich das Isolatpaar HCMV 40E und HCMV 40F als ein geeignetes Zell-Virus-System bestätigt, um Unterschiede im Zelltropismus bei HCMV näher zu untersuchen. Die Bedeutung der Leserahmen UL32 und UL128 für die Ausprägung des Endothelzelltropismus von HCMV kann nun in weiterführenden phänotypischen Analysen geklärt werden.

## **7 Anhang**

### **7.1 Übersicht**

**7.1.1 Anhang 1:** Basensequenzvergleich der HCMV Stämme 40 E, 40F und AD169 im offenen Leserahmen UL24 Seite 76-77

**7.1.2 Anhang 2:** Aminosäuresequenzvergleich der HCMV Stämme 40 E, 40F und AD169 im offenen Leserahmen UL24. Seite 78

**7.1.3 Anhang 3:** Basensequenzvergleich der HCMV Stämme 40 E, 40F und AD169 im offenen Leserahmen UL48. Seite 79-87

**7.1.4 Anhang 4:** Aminosäuresequenzvergleich der HCMV Stämme 40 E, 40F und AD169 im offenen Leserahmen UL48. Seite 88-90

**7.1.5 Anhang 5:** Basensequenzvergleich der HCMV Stämme 40 E, 40F und AD169 im offenen Leserahmen UL32. Seite 91-93

**7.1.6 Anhang 6:** Aminosäuresequenzvergleich der HCMV Stämme 40 E, 40F und AD169 im offenen Leserahmen UL32. Seite 94

## 7.1.1 Anhang 1

**Basensequenzvergleich der HCMV Stämme 40 E, 40F und AD169 im offenen Leserahmen UL24.** Rot unterlegt sind die Unterschiede im Vergleich HCMV 40E/F zu HCMV AD169. Schwarz unterlegt sind die Unterschiede im Vergleich HCMV 40E zu HCMV 40F und HCMV AD169.

1	ATGAGCGATCTGGCTAGCCTGGCGCTCACGGCCGAGTTCGGCCTGGGCTG	UL24	AD169.SEQ
1	ATGAGCGATCTGGCTAGCCTGGCGCTCACGGCCGAGTTCGGCCTGGGCTG	UL24	40E.SEQ
1	ATGAGCGATCTGGCTAGCCTGGCGCTCACGGCCGAGTTCGGCCTGGGCTG	UL24	40F.SEQ
51	TCTGGAAGCTTACGTGCGCATCAACGCAGGCCAGGTGTTGCCCGTGGTCT	UL24	AD169.SEQ
51	TCTGGAAGCTTACGTGCGCATCAACGCAGGCCAGGTGTTGCCCGTGGTCT	UL24	40E.SEQ
51	TCTGGAAGCTTACGTGCGCATCAACGCAGGCCAGGTGTTGCCCGTGGTCT	UL24	40F.SEQ
101	GGCCGCCGGGCTGGAACCTAGTGCTGCAGGAGATCGAGACGGACGAGGAC	UL24	AD169.SEQ
101	GGCCGCCGGGCTGGAACCTAGTGCTGCAGGAGATCGAGACGGACGAGGAC	UL24	40E.SEQ
101	GGCCGCCGGGCTGGAACCTAGTGCTGCAGGAGATCGAGACGGACGAGGAC	UL24	40F.SEQ
151	TTCAAACCGGAGGACGTGAAAGCCTTGGAGTCACTACCTGTGTGTCAGAC	UL24	AD169.SEQ
151	TTCAAACCGGAGGACGTGAAAGCCTTGGAGTCACTACCTGTGTGTCAGAC	UL24	40E.SEQ
151	TTCAAACCGGAGGACGTGAAAGCCTTGGAGTCACTACCTGTGTGTCAGAC	UL24	40F.SEQ
201	GCGCCTGGCCTTCGTGGGTCGCTTCGTGAACGAGGCCGTGTTGTGCGCCG	UL24	AD169.SEQ
201	GCGCCTGGCCTTCGTGGGTCGCTTCGTGAACGAGGCCGTGTTGTGCGCCG	UL24	40E.SEQ
201	GCGCCTGGCCTTCGTGGGTCGCTTCGTGAACGAGGCCGTGTTGTGCGCCG	UL24	40F.SEQ
251	ATCAGCAGAAGAAGACCGCGGTGTGCCTCATCTCGGACGAGGGCTATGTT	UL24	AD169.SEQ
251	ATCAGCAGAAGAAGACCGCGGTGTGCCTCATCTCGGACGAGGGCTATGTT	UL24	40E.SEQ
251	ATCAGCAGAAGAAGACCGCGGTGTGCCTCATCTCGGACGAGGGCTATGTT	UL24	40F.SEQ
301	TTTTTGCTATGTACGCGAGGACACCGCCGTCTACTACCTGGCCCGCAACCT	UL24	AD169.SEQ
301	TTTTTGCTATGTACGCGAGGACACCGCCGTCTACTACCTGGCCCGCAACCT	UL24	40E.SEQ
301	TTTTTGCTATGTACGCGAGGACACCGCCGTCTACTACCTGGCCCGCAACCT	UL24	40F.SEQ
351	CATGGAGTTTTCGCGCGCTCGGGCTGCGCGCCGTTCGAGACCCTGCACTGCA	UL24	AD169.SEQ
351	CATGGAGTTTTCGCGCGCTCGGGCTGCGCGCCGTTCGAGACCCTGCACTGCA	UL24	40E.SEQ
351	CATGGAGTTTTCGCGCGCTCGGGCTGCGCGCCGTTCGAGACCCTGCACTGCA	UL24	40F.SEQ
401	TGCGCTACCTGACCTCGTCGTTGGTTAAGCGCTACTTTTCGCCCCTGTTG	UL24	AD169.SEQ
401	TGCGCTACCTGACCTCGTCGTTGGTTAAGCGCTACTTTTCGCCCCTGTTG	UL24	40E.SEQ
401	TGCGCTACCTGACCTCGTCGTTGGTTAAGCGCTACTTTTCGCCCCTGTTG	UL24	40F.SEQ
451	CGCGCCTGGAGCCTCGGTTTGGATACCATGGCGCGATTTCATCATCCGCCA	UL24	AD169.SEQ
451	CGCGCCTGGAGCCTCGGTTTGGATACCATGGCGCGATTTCATCATCCGCCA	UL24	40E.SEQ
451	CGCGCCTGGAGCCTCGGTTTGGATACCATGGCGCGATTTCATCATCCGCCA	UL24	40F.SEQ
501	CCACGGGCAGTTTCATGCCGTTGACGTACCCGCCGGGAACGGAACCTGCGTC	UL24	AD169.SEQ
501	CCACGGGCAGTTTCATGCCGTTGACGTACCCGCCGGGAACGGAACCTGCGTC	UL24	40E.SEQ
501	CCACGGGCAGTTTCATGCCGTTGACGTACCCGCCGGGAACGGAACCTGCGTC	UL24	40F.SEQ
551	TATGCAACCTCAGGTGTTTCGAAAACAGCGTGGAAGGCGGTCACCTTGCTG	UL24	AD169.SEQ
551	TATGCAACCTCAGGTGTTTCGAAAACAGCGTGGAAGGCGGTCACCTTGCTG	UL24	40E.SEQ
551	TATGCAACCTCAGGTGTTTCGAAAACAGCGTGGAAGGCGGTCACCTTGCTG	UL24	40F.SEQ
601	CGCAACATCAAAAACCGCTTTCGGAATGCGCGTTCTCGGCCTGGGAACCGT	UL24	AD169.SEQ
601	CGCAACATCAAAAACCGCTTTCGGAATGCGCGTTCTCGGCCTGGGAACCGT	UL24	40E.SEQ
601	CGCAACATCAAAAACCGCTTTCGGAATGCGCGTTCTCGGCCTGGGAACCGT	UL24	40F.SEQ
651	CAGCCTCAAGGGCGAGAACGCGCCCTTTCCTCACTTGCGCTGGCCCGTTCG	UL24	AD169.SEQ
651	CAGCCTCAAGGGCGAGAACGCGCCCTTTCCTCACTTGCGCTGGCCCGTTCG	UL24	40E.SEQ
651	CAGCCTCAAGGGCGAGAACGCGCCCTTTCCTCACTTGCGCTGGCCCGTTCG	UL24	40F.SEQ
701	ACCTTATCCCACATCGTCGCTCGCCTATACCGGGCCGTCTACGCTGCGAC	UL24	AD169.SEQ
701	ACCTTATCCCACATCGTCGCTCGCCTATACCGGGCCGTCTACGCTGCGAC	UL24	40E.SEQ
701	ACCTTATCCCACATCGTCGCTCGCCTATACCGGGCCGTCTACGCTGCGAC	UL24	40F.SEQ

```

751 GTGCGCGACGACCGCTACATCCGGGTGGGAGATAATCTCAACACGTTTCAT UL24 AD169.SEQ
751 GTGCGCGACGACCGCTACATCCGGGTGGGAGATAATCTCAACACGTTTCAT UL24 40E.SEQ
751 GTGCGCGACGACCGCTACATCCGGGTGGGAGATAATCTCAACACGTTTCAT UL24 40F.SEQ

801 GTGTCTGGGACTTAACCTGCTGTTTGTAAAACCGACGTTTCAGCGGCCACA UL24 AD169.SEQ
801 GTGTCTGGGACTTAACCTGCTGTTTGTAAAACCGACGTTTCAGCGGCCACA UL24 40E.SEQ
801 GTGTCTGGGACTTAACCTGCTGTTTGTAAAACCGACGTTTCAGCGGCCACA UL24 40F.SEQ

851 ACGGCATCTACGATCGCGTGCCCGACTGCCCCAAAGGACGTCAGCACCGT UL24 AD169.SEQ
851 ACGGCATCTACGATCGCGTGCCCGACTGCCCCAAAGGACGTCAGCACCGT UL24 40E.SEQ
851 ACGGCATCTACGATCGCGTGCCCGACTGCCCCAAAGGACGTCAGCACCGT UL24 40F.SEQ

901 TGA UL24 AD169.SEQ
901 TGA UL24 40E.SEQ
901 TGA UL24 40F.SEQ

```

Decoration 'Decoration #1': Shade (with solid light gray) residues that differ from UL24 AD169.SEQ.

Decoration 'Decoration #2': Shade (with solid black) residues that differ from UL24 40E.SEQ.

## 7.1.2 Anhang 2

**Aminosäuresequenzvergleich** der HCMV Stämme 40 E, 40F und AD169 im offenen Leserahmen **UL24**. Rot unterlegt sind die Unterschiede im Vergleich HCMV 40E/F zu HCMV AD169. Schwarz unterlegt sind die Unterschiede im Vergleich HCMV 40E zu HCMV 40F und HCMV AD169.

```

1   MSDLASLALTAEFGLGCLEAYVRINAGQVLPVVWPPGWNLVLQEIETDED UL24 AD169.SEQ
1   MSDLASLALTAEFGLGCLEAYVRINAGQVLPVVWPPGWNLVLQEIETDED UL24 40E.SEQ
1   MSDLASLALTAEFGLGCLEAYVRINAGQVLPVVWPPGWNLVLQEIETDED UL24 40F.SEQ

151 FKPEDVKAWSHYLCCQTRLAFVGRFVNEGVLSPDQQKKTAVCLISDEGYV UL24 AD169.SEQ
151 FKPEDVKAWSHYLCCETRLAFVGRFVNEAVLSPDQQKKTAVCLISDEGYV UL24 40E.SEQ
151 FKPEDVKAWSHYLCCETRLAFVGRFVNEAVLSPDQQKKTAVCLISDEGYV UL24 40F.SEQ

301 FCYVREDTAVYYLARNLMEFARVGLRAVETLHCMRYLTSSLVKRYFRPLL UL24 AD169.SEQ
301 FCYVREDTAVYYLARNLMEFARVGLRAVETLHCMRYLTSSLVKRYFRPLL UL24 40E.SEQ
301 FCYVREDTAVYYLARNLMEFARVGLRAVETLHCMRYLTSSLVKRYFRPLL UL24 40F.SEQ

451 RAWSLGLDTMARFIIRHHGQFMPLTYPPGTELRLCNLRCFENSVEGGHLL UL24 AD169.SEQ
451 RAWSLGLDTMARFIIRHHGQFMPLTYPPGTELRLCNLRCFENSVEGGHLL UL24 40E.SEQ
451 RAWSLGLDTMARFIIRHHGQFMPLTYPPGTELRLCNLRCFENSVEGGHLL UL24 40F.SEQ

601 RNIKTAFGMRVLGLGTVSLKGENAPFPHLRWPVDLIPIVVAYTGAVYACD UL24 AD169.SEQ
601 RNIKTAFGMRVLGLGTVSLKGENAPFPHLRWPVDLIPIVVAYTGAVYACD UL24 40E.SEQ
601 RNIKTAFGMRVLGLGTVSLKGENAPFPHLRWPVDLIPIVVAYTGAVYACD UL24 40F.SEQ

751 VRDDRYIRVGDNLNTFMCLGLNLLFENRRFSGHNGIYDRVPDCPKGRQHR UL24 AD169.SEQ
751 VRDDRYIRVGDNLNTFMCLGLNLLFENRRFSGHNGIYDRVPDCPKGRQHR UL24 40E.SEQ
751 VRDDRYIRVGDNLNTFMCLGLNLLFENRRFSGHNGIYDRVPDCPKGRQHR UL24 40F.SEQ

901 . UL24 AD169.SEQ
901 . UL24 40E.SEQ
901 . UL24 40F.SEQ

```

Decoration 'Decoration #1': Shade (with solid light gray) residues that differ from UL24 AD169.SEQ.

Decoration 'Decoration #2': Shade (with solid black) residues that differ from UL24 40E.SEQ.

### 7.1.3 Anhang 3

**Basensequenzvergleich der HCMV Stämme 40 E, 40F und AD169 im offenen Leserahmen UL48.** Rot unterlegt sind die Unterschiede im Vergleich HCMV 40E/F zu HCMV AD169. Schwarz unterlegt sind die Unterschiede im Vergleich HCMV 40E zu HCMV 40F und HCMV AD169.

1	ATGAAAGTCAC <b>A</b> CAGGCCAGCTGCCACCAGGGCGACATCGCTCGCTTTGG	UL48	AD169.SEQ
1	ATGAAAGTCAC <b>C</b> CAGGCCAGCTGCCACCAGGGCGACATCGCTCGCTTTGG	UL48	40E.SEQ
1	ATGAAAGTCAC <b>C</b> CAGGCCAGCTGCCACCAGGGCGACATCGCTCGCTTTGG	UL48	40F.SEQ
51	AGCGCGAGCGGGCAATCAATGCGTCTGCAACGGCATCATGTTCCCTACACG	UL48	AD169.SEQ
51	AGCGCGAGCGGGCAATCAATGCGTCTGCAACGGCATCATGTTCCCTACACG	UL48	40E.SEQ
51	AGCGCGAGCGGGCAATCAATGCGTCTGCAACGGCATCATGTTCCCTACACG	UL48	40F.SEQ
101	CCTTGCACCTGGGTGGAACGAGCGCCGTCTGCAGACCGAGGCGCTGGAC	UL48	AD169.SEQ
101	CCTTGCACCTGGGTGGAACGAGCGCCGTCTGCAGACCGAGGCGCTGGAC	UL48	40E.SEQ
101	CCTTGCACCTGGGTGGAACGAGCGCCGTCTGCAGACCGAGGCGCTGGAC	UL48	40F.SEQ
151	GCCATCATGGAAGAGGGCGCGCGTCTGGACGCGCGGCTAGAGCGCGAGTT	UL48	AD169.SEQ
151	GCCATCATGGAAGAGGGCGCGCGTCTGGACGCGCGGCTAGAGCGCGAGTT	UL48	40E.SEQ
151	GCCATCATGGAAGAGGGCGCGCGTCTGGACGCGCGGCTAGAGCGCGAGTT	UL48	40F.SEQ
201	GCAAAGAAGCTGCCCGCCGGCGGGCGGCTGCCGGTCTAC <b>A</b> GACTGGGCG	UL48	AD169.SEQ
201	GCAAAGAAGCTGCCCGCCGGCGGGCGGCTGCCGGTCTAC <b>C</b> GACTGGGCG	UL48	40E.SEQ
201	GCAAAGAAGCTGCCCGCCGGCGGGCGGCTGCCGGTCTAC <b>C</b> GACTGGGCG	UL48	40F.SEQ
251	ACGAAGTGCCGCGCCGCTGGAGTCGCGGTTCGGCCGGACCGTGCACGCG	UL48	AD169.SEQ
251	ACGAAGTGCCGCGCCGCTGGAGTCGCGGTTCGGCCGGACCGTGCACGCG	UL48	40E.SEQ
251	ACGAAGTGCCGCGCCGCTGGAGTCGCGGTTCGGCCGGACCGTGCACGCG	UL48	40F.SEQ
301	CTCTCGCGGCCCTTCAACGGCACCACCGAGACGTGCGACCTGGACGGCTA	UL48	AD169.SEQ
301	CTCTCGCGGCCCTTCAACGGCACCACCGAGACGTGCGACCTGGACGGCTA	UL48	40E.SEQ
301	CTCTCGCGGCCCTTCAACGGCACCACCGAGACGTGCGACCTGGACGGCTA	UL48	40F.SEQ
351	CATGTGTCCGGGCATCTT <b>C</b> GACTTTCTGCGGTACGCGCACGCCAAACCGC	UL48	AD169.SEQ
351	CATGTGTCCGGGCATCTT <b>T</b> GACTTTCTGCGGTACGCGCACGCCAAACCGC	UL48	40E.SEQ
351	CATGTGTCCGGGCATCTT <b>T</b> GACTTTCTGCGGTACGCGCACGCCAAACCGC	UL48	40F.SEQ
401	GTCCACCTACGTACTCGTCACCGTCAACTCGTTGGCGCGCGCCGTGGTC	UL48	AD169.SEQ
401	GTCCACCTACGTACTCGTCACCGTCAACTCGTTGGCGCGCGCCGTGGTC	UL48	40E.SEQ
401	GTCCACCTACGTACTCGTCACCGTCAACTCGTTGGCGCGCGCCGTGGTC	UL48	40F.SEQ
451	TTCACCGAGGACCACATGTTGGTCTTTGATCCGCACAGCTCCGCGGAATG	UL48	AD169.SEQ
451	TTCACCGAGGACCACATGTTGGTCTTTGATCCGCACAGCTCCGCGGAATG	UL48	40E.SEQ
451	TTCACCGAGGACCACATGTTGGTCTTTGATCCGCACAGCTCCGCGGAATG	UL48	40F.SEQ
501	TCACAACGCCGCCGTGTATCACTGCGAGGGTCTCCATCAGGTGCTGATGG	UL48	AD169.SEQ
501	TCACAACGCCGCCGTGTATCACTGCGAGGGTCTCCATCAGGTGCTGATGG	UL48	40E.SEQ
501	TCACAACGCCGCCGTGTATCACTGCGAGGGTCTCCATCAGGTGCTGATGG	UL48	40F.SEQ
551	TGCTCACGGGCTTCGGCGTGCAGCT <b>C</b> TCGCCCGCTTTCTACTATGAGGCC	UL48	AD169.SEQ
551	TGCTCACGGGCTTCGGCGTGCAGCT <b>A</b> TCGCCCGCTTTCTACTATGAGGCC	UL48	40E.SEQ
551	TGCTCACGGGCTTCGGCGTGCAGCT <b>A</b> TCGCCCGCTTTCTACTATGAGGCC	UL48	40F.SEQ
601	CTTTTTCTCTACATGCTGGATGTGGCGACCGT <b>A</b> CCAGAGGCTGAGATCGC	UL48	AD169.SEQ
601	CTTTTTCTCTACATGCTGGATGTGGCGACCGT <b>G</b> TCCAGAGGCTGAGATCGC	UL48	40E.SEQ
601	CTTTTTCTCTACATGCTGGATGTGGCGACCGT <b>G</b> TCCAGAGGCTGAGATCGC	UL48	40F.SEQ
651	CGC <b>C</b> CGTTTGGTCTCCACCTATCGCGACCGGATATCGACCTCACCGGCG	UL48	AD169.SEQ
651	CGC <b>A</b> CGTTTGGTCTCCACCTATCGCGACCGGATATCGACCTCACCGGCG	UL48	40E.SEQ
651	CGC <b>A</b> CGTTTGGTCTCCACCTATCGCGACCGGATATCGACCTCACCGGCG	UL48	40F.SEQ
701	TCGT <b>C</b> CGAGAAAGCGCGGACACGGC <b>A</b> GCGACAACGACCACCGCCGCACCT	UL48	AD169.SEQ
701	TCGT <b>T</b> CGAGAAAGCGCGGACACGGC <b>G</b> GCGACAACGACCACCGCCGCACCT	UL48	40E.SEQ
701	TCGT <b>T</b> CGAGAAAGCGCGGACACGGC <b>G</b> GCGACAACGACCACCGCCGCACCT	UL48	40F.SEQ

751 TCCTTACCTCCGCTGCCCCGACCCCATCGTCGACCCGGGTTGCCCTCCTGG UL48 AD169.SEQ  
 751 TCCTTACCTCCGCTGCCCCGACCCCATCGTCGACCCGGGTTGCCCTCCTGG UL48 40E.SEQ  
 751 TCCTTACCTCCGCTGCCCCGACCCCATCGTCGACCCGGGTTGCCCTCCTGG UL48 40F.SEQ  
  
 801 CGTGGCGCCCAGCATTCCCGTCTACGATCCCTCGTCCCTCACCCAAAAAAA UL48 AD169.SEQ  
 801 CGTGGCGCCCAGCATTCCCGTCTACGATCCCTCGTCCCTCACCCAAAAAAA UL48 40E.SEQ  
 801 CGTGGCGCCCAGCATTCCCGTCTACGATCCCTCGTCCCTCACCCAAAAAAA UL48 40F.SEQ  
  
 851 CACCCGAGAAACGCCGCAAGGACCTCAGCGGTAGCAAACACGGAGGCAA UL48 AD169.SEQ  
 851 CACCCGAGAAACGCCGCAAGGACCTCAGCGGTAGCAAACACGGAGGCAA UL48 40E.SEQ  
 851 CACCCGAGAAACGCCGCAAGGACCTCAGCGGTAGCAAACACGGAGGCAA UL48 40F.SEQ  
  
 901 AAGAAACCCCCGTCCACGACGTCCAAAACACTGGCCACCGCCTCCTCCTC UL48 AD169.SEQ  
 901 AAGAAACCCCCGTCCACGACGTCCAAAACACTGGCCACCGCCTCCTCCTC UL48 40E.SEQ  
 901 AAGAAACCCCCGTCCACGACGTCCAAAACACTGGCCACCGCCTCCTCCTC UL48 40F.SEQ  
  
 951 CCCC TCAGCGATAGCGGGCCCTCTTCTTCGTCCGCGGTACCACCGTCCT UL48 AD169.SEQ  
 951 C--- TCAGCGATAGCGGGCCCTCTTCTTCGTCCGCGGTACCACCGTCCT UL48 40E.SEQ  
 951 C--- TCAGCGATAGCGGGCCCTCTTCTTCGTCCGCGGTACCACCGTCCT UL48 40F.SEQ  
  
 1001 ACAGCTGCGGCGAAGGGGCCCTGCCGGCCCTGGGCCGCTACCAACAGCTG UL48 AD169.SEQ  
 998 ACAGCTGCGGCGAAGGGGCCCTGCCGGCCCTGGGCCGCTACCAACAGCTG UL48 40E.SEQ  
 998 ACAGCTGCGGCGAAGGGGCCCTGCCGGCCCTGGGCCGCTACCAACAGCTG UL48 40F.SEQ  
  
 1051 GTCGACGAGGTAGAGCAGGAGTTGAAGGCTCTGACGCTGCCGCCGTTGCC UL48 AD169.SEQ  
 1048 GTCGACGAGGTAGAGCAGGAGTTGAAGGCTCTGACGCTGCCGCCGTTGCC UL48 40E.SEQ  
 1048 GTCGACGAGGTAGAGCAGGAGTTGAAGGCTCTGACGCTGCCGCCGTTGCC UL48 40F.SEQ  
  
 1101 TGCCAACACCAGCGCCTGGACGTTGCACGCGGGTACC GAAAGCGGCG UL48 AD169.SEQ  
 1098 TGCCAACACCAGCGCCTGGACGTTGCACGCGGGTACC GAAAGCGGCG UL48 40E.SEQ  
 1098 TGCCAACACCAGCGCCTGGACGTTGCACGCGGGTACC GAAAGCGGCG UL48 40F.SEQ  
  
 1151 CTAACGCGGCAACGGCCACGGCGCCGTCCTTCGACGAAGCTTTCCTCACC UL48 AD169.SEQ  
 1148 CTAACGCGGCAACGGCCACGGCGCCGTCCTTCGACGAAGCTTTCCTCACC UL48 40E.SEQ  
 1148 CTAACGCGGCAACGGCCACGGCGCCGTCCTTCGACGAAGCTTTCCTCACC UL48 40F.SEQ  
  
 1201 GATCGTCTCCAGCAGCTCATCATCCATGCCGTCAATCAGCGCTCGTGTCT UL48 AD169.SEQ  
 1198 GATCGTCTCCAGCAGCTCATCATCCATGCCGTCAATCAGCGCTCGTGTCT UL48 40E.SEQ  
 1198 GATCGTCTCCAGCAGCTCATCATCCATGCCGTCAATCAGCGCTCGTGTCT UL48 40F.SEQ  
  
 1251 GCGTCGCCCCCTGCGGTCCGCAATCGGCGGCGCAGCAGGCGGTACGCGCCT UL48 AD169.SEQ  
 1248 GCGTCGCCCCCTGCGGTCCGCAATCGGCGGCGCAGCAGGCGGTACGCGCCT UL48 40E.SEQ  
 1248 GCGTCGCCCCCTGCGGTCCGCAATCGGCGGCGCAGCAGGCGGTACGCGCCT UL48 40F.SEQ  
  
 1301 ATCTGGGCCTATCCAAGAAA CTGGATGCCTTTCTGCTCAACTGGCTGCAC UL48 AD169.SEQ  
 1298 ATCTGGGCCTATCCAAGAAA TTGGATGCCTTTCTGCTCAACTGGCTGCAC UL48 40E.SEQ  
 1298 ATCTGGGCCTATCCAAGAAA TTGGATGCCTTTCTGCTCAACTGGCTGCAC UL48 40F.SEQ  
  
 1351 CACGGCCTGGATCTGCA GCGCATGCACGACTACCTGAGCCACAAGACCAC UL48 AD169.SEQ  
 1348 CACGGCCTGGATCTGCA GCGCATGCACGACTACCTGAGCCACAAGACCAC UL48 40E.SEQ  
 1348 CACGGCCTGGATCTGCA GCGCATGCACGACTACCTGAGCCACAAGACCAC UL48 40F.SEQ  
  
 1401 CAAAGGCACGTA CTGACGCTGGATCGCGCACTGCTGGAGAA ATGCAAG UL48 AD169.SEQ  
 1398 CAAAGGCACGTA CTGACGCTGGATCGCGCACTGCTGGAGAA ATGCAAG UL48 40E.SEQ  
 1398 CAAAGGCACGTA CTGACGCTGGATCGCGCACTGCTGGAGAA ATGCAAG UL48 40F.SEQ  
  
 1451 TCGTCTTCGATCCCTACGGACGTCAGCACGGCCCGGCGCTCATCGCCTGG UL48 AD169.SEQ  
 1448 TCGTCTTCGATCCCTACGGACGTCAGCACGGCCCGGCGCTCATCGCCTGG UL48 40E.SEQ  
 1448 TCGTCTTCGATCCCTACGGACGTCAGCACGGCCCGGCGCTCATCGCCTGG UL48 40F.SEQ



1501 GTGGAGGAGATGCTCGCTACGTGGAAAGCAAGCCACTAACGAACTGTC UL48 AD169.SEQ  
1498 GTGGAGGAGATGCTACGCTACGTGGAAAGCAAGCCACTAACGAACTGTC UL48 40E.SEQ  
1498 GTGGAGGAGATGCTACGCTACGTGGAAAGCAAGCCACTAACGAACTGTC UL48 40F.SEQ  
  
1551 TCAACGACTGCAACGTTTCGTAACCAAGCGACCGATGCCCGTTAGCGACA UL48 AD169.SEQ  
1548 TCAACGACTGCAACGTTTCGTAACCAAGCGACCGATGCCCGTTAGTGACA UL48 40E.SEQ  
1548 TCAACGACTGCAACGTTTCGTAACCAAGCGACCGATGCCCGTTAGTGACA UL48 40F.SEQ  
  
1601 GCTTCGTCTGCCTGCGACCCGTAGACTTTTACGCGTCTGACGCAGGTCATC UL48 AD169.SEQ  
1598 GCTTCGTCTGCCTGCGACCCGTAGACTTTTACGCGTCTGACGCAGGTCATC UL48 40E.SEQ  
1598 GCTTCGTCTGCCTGCGACCCGTAGACTTTTACGCGTCTGACGCAGGTCATC UL48 40F.SEQ  
  
1651 GAACAGCGACGTCGGGTGTTGCAACGTCAACGCGAGGAAATACCACGGCGT UL48 AD169.SEQ  
1648 GAACAGCGACGTCGGGTGTTGCAACGTCAACGCGAGGAGTACCACGGCGT UL48 40E.SEQ  
1648 GAACAGCGACGTCGGGTGTTGCAACGTCAACGCGAGGAGTACCACGGCGT UL48 40F.SEQ  
  
1701 TTACGAGCACTTGGCCGGCCTCATCACCAGCATCGACATTCACGACCTAG UL48 AD169.SEQ  
1698 TTACGAGCACTTGGCCGGCCTCATCACCAGCATCGACATTCACGACCTAG UL48 40E.SEQ  
1698 TTACGAGCACTTGGCCGGCCTCATCACCAGCATCGACATTCACGACCTAG UL48 40F.SEQ  
  
1751 ACGCCAGCGATCTGAACCGACGCGAAATTCTGAAAGCGCTGCAGCCGTTG UL48 AD169.SEQ  
1748 ACGCCAGCGATCTGAACCGACGCGAAATTCTGAAAGCGCTGCAGCCGTTG UL48 40E.SEQ  
1748 ACGCCAGCGATCTGAACCGACGCGAAATTCTGAAAGCGCTGCAGCCGTTG UL48 40F.SEQ  
  
1801 GACGACAACGCCAAGCAGGAACTCTTTCGCCTGGGCAACGCCAAAATGCT UL48 AD169.SEQ  
1798 GACGACAACGCCAAGCAGGAACTCTTTCGCCTGGGCAACGCCAAAATGCT UL48 40E.SEQ  
1798 GACGACAACGCCAAGCAGGAACTCTTTCGCCTGGGCAACGCCAAAATGCT UL48 40F.SEQ  
  
1851 AGAGTTGCAGATGGACCTGGACCGTCTGAGCACGCAGCTGCTGACGCGCG UL48 AD169.SEQ  
1848 AGAGTTGCAGATGGACCTGGACCGTCTGAGCACGCAGCTGCTACGCGCG UL48 40E.SEQ  
1848 AGAGTTGCAGATGGACCTGGACCGTCTGAGCACGCAGCTGCTACGCGCG UL48 40F.SEQ  
  
1901 TGCACAATCACATCCTTAACGGCTTTTTGCCGGTAGAGGACCTGAAGCAG UL48 AD169.SEQ  
1898 TGCACAATCACATCCTCAACGGCTTTTTGCCGGTAGAGGACCTGAAGCAG UL48 40E.SEQ  
1898 TGCACAATCACATCCTCAACGGCTTTTTGCCGGTAGAGGACCTGAAGCAG UL48 40F.SEQ  
  
1951 ATGGAACGCGTCGTCGAGCAGGTAAGTACTGAGACTCTTTTACGACCTGCGCGA UL48 AD169.SEQ  
1948 ATGGAACGCGTCGTCGAGCAGGTAAGTACTGAGACTCTTTTACGACCTGCGCGA UL48 40E.SEQ  
1948 ATGGAACGCGTCGTCGAGCAGGTAAGTACTGAGACTCTTTTACGACCTGCGCGA UL48 40F.SEQ  
  
2001 CCTGAAACTGTGTGACGGCAGCTACGAAGAGGGATTGTCGTCATACGCG UL48 AD169.SEQ  
1998 CCTGAAACTGTGTGACGGCAGCTACGAAGAGGGATTGTCGTCATACGCG UL48 40E.SEQ  
1998 CCTGAAACTGTGTGACGGCAGCTACGAAGAGGGATTGTCGTCATACGCG UL48 40F.SEQ  
  
2051 AACAACTGAGCTACCTCATGACGGGCACTGTGCGGACAACGTACCGCTA UL48 AD169.SEQ  
2048 AACAACTGAGCTACCTCATGACGGGCACTGTGCGGACAACGTACCGCTA UL48 40E.SEQ  
2048 AACAACTGAGCTACCTCATGACGGGCACTGTGCGGACAACGTACCGCTA UL48 40F.SEQ  
  
2101 CTGCAAGAGATCCTGCAGCTGCGACACGCGTACCAGCAAGCCACGCAGCA UL48 AD169.SEQ  
2098 CTGCAAGAGATCCTGCAGCTGCGACACGCGTACCAGCAAGCCACGCAGCA UL48 40E.SEQ  
2098 CTGCAAGAGATCCTGCAGCTGCGACACGCGTACCAGCAAGCCACGCAGCA UL48 40F.SEQ  
  
2151 AAACGAGGGTCGCTCACGCAGATCACGACCTGCTTCATGTCATCGAGA UL48 AD169.SEQ  
2148 AAACGAGGGTCGCTCACGCAGATCACGACCTGCTTCATGTCATCGAGA UL48 40E.SEQ  
2148 AAACGAGGGTCGCTCACGCAGATCACGACCTGCTTCATGTCATCGAGA UL48 40F.SEQ  
  
2201 CGCTGGTGC GCGACCCGGGAGCCGCGGCTCGGCGCTGACACTGGCCTTG UL48 AD169.SEQ  
2198 CGCTGGTGC GCGACCCGGGAGCCGCGGCTCGGCGCTGACACTGGCCTTG UL48 40E.SEQ  
2198 CGCTGGTGC GCGACCCGGGAGCCGCGGCTCGGCGCTGACACTGGCCTTG UL48 40F.SEQ

2251 GTACAGGAGCAGCTAGCTCAGCTGGAAGCGCTAGGCGGCCTGCAGCTACC UL48 AD169.SEQ  
 2248 GTACAGGAGCAGCTAGCTCAGCTGGAAGCGCTAGGCGGCCTGCAGCTACC UL48 40E.SEQ  
 2248 GTACAGGAGCAGCTAGCTCAGCTGGAAGCGCTAGGCGGCCTGCAGCTACC UL48 40F.SEQ  
  
 2301 CGAAGTGCAGCAGCGCCTACAGAACGCGCAACTCGCGCTAAGCCGCCTCT UL48 AD169.SEQ  
 2298 CGAAGTGCAGCAGCGCCTACAGAACGCGCAACTCGCGCTAAGCCGCCTCT UL48 40E.SEQ  
 2298 CGAAGTGCAGCAGCGCCTACAGAACGCGCAACTCGCGCTAAGCCGCCTCT UL48 40F.SEQ  
  
 2351 ACGAAGAGGAAGAGGAAACGCGAGCGTTTCTCGACGGACTCTCGTACGAC UL48 AD169.SEQ  
 2348 ACGAAGAGGAAGAGGAAACGCGAGCGTTTCTCGACGGACTCTCGTACGAC UL48 40E.SEQ  
 2348 ACGAAGAGGAAGAGGAAACGCGAGCGTTTCTCGACGGACTCTCGTACGAC UL48 40F.SEQ  
  
 2401 GATCCGCCCAACGAACAGACCATCAAGCGACACCCACAATTACGCGAGAT UL48 AD169.SEQ  
 2398 GATCCGCCCAACGAACAGACCATCAAGCGACACCCACAATTACGCGAGAT UL48 40E.SEQ  
 2398 GATCCGCCCAACGAACAGACCATCAAGCGACACCCACAATTACGCGAGAT UL48 40F.SEQ  
  
 2451 GTTACGTGCGGACGAACAGACGCGTCTGCGACTCATCAACGCCGTACTGA UL48 AD169.SEQ  
 2448 GTTACGTGCGGACGAACAGACGCGTCTGCGACTCATCAACGCCGTACTGA UL48 40E.SEQ  
 2448 GTTACGTGCGGACGAACAGACGCGTCTGCGACTCATCAACGCCGTACTGA UL48 40F.SEQ  
  
 2501 GCATGTTCCACACATTAGTGATGCGACTGGCGCGGACGAGTCGCCGCGA UL48 AD169.SEQ  
 2498 GCATGTTCCACACATTAGTGATGCGACTGGCGCGGACGAGTCGCCGCGA UL48 40E.SEQ  
 2498 GCATGTTCCACACATTAGTGATGCGACTGGCGCGGACGAGTCGCCGCGA UL48 40F.SEQ  
  
 2551 CCGACGTTTTTTTGACGCCGTGAGTTTGTGTTGTCAGCAACTGCCACCCGA UL48 AD169.SEQ  
 2548 CCGACGTTTTTTTGACGCCGTGAGTTTGTGTTGTCAGCAACTGCCACCCGA UL48 40E.SEQ  
 2548 CCGACGTTTTTTTGACGCCGTGAGTTTGTGTTGTCAGCAACTGCCACCCGA UL48 40F.SEQ  
  
 2601 CTCGCACGAACGTGAGGATCTGCGTGCCGCCAACGCCACGTACGCGCAGA UL48 AD169.SEQ  
 2598 CTCGCACGAACGTGAGGATCTGCGTGCCGCCAACGCCACGTACGCGCAGA UL48 40E.SEQ  
 2598 CTCGCACGAACGTGAGGATCTGCGTGCCGCCAACGCCACGTACGCGCAGA UL48 40F.SEQ  
  
 2651 TGGTCAAGAAACTGGAGCAGATCGAGAAAGCCGGTACCGGCGCATCCGAA UL48 AD169.SEQ  
 2648 TGGTCAAGAAACTGGAGCAGATCGAGAAAGCCGGTACCGGCGCATCCGAA UL48 40E.SEQ  
 2648 TGGTCAAGAAACTGGAGCAGATCGAGAAAGCCGGTACCGGCGCATCCGAA UL48 40F.SEQ  
  
 2701 AAACGTTTTCCAAGCGTTACGGGAGTTGGTTTACTTTTTCCGTAATCATGA UL48 AD169.SEQ  
 2698 AAACGTTTTCCAAGCGTTACGGGAGTTGGTTTACTTTTTCCGTAATCATGA UL48 40E.SEQ  
 2698 AAACGTTTTCCAAGCGTTACGGGAGTTGGTTTACTTTTTCCGTAATCATGA UL48 40F.SEQ  
  
 2751 ATATTTCTTTCAACATATGGTTCGGACGACTGGGCGTCGGACCTCAGGTAA UL48 AD169.SEQ  
 2748 ATATTTCTTTCAACATATGGTTCGGACGACTGGGCGTCGGACCTCAGGTAA UL48 40E.SEQ  
 2748 ATATTTCTTTCAACATATGGTTCGGACGACTGGGCGTCGGACCTCAGGTAA UL48 40F.SEQ  
  
 2801 CGGAACCTCTACGAGCGATATCAACACGAGATGGAAGAACAGCACCTGGAA UL48 AD169.SEQ  
 2798 CGGAACCTCTACGAGCGATATCAACACGAGATGGAAGAACAGCACCTGGAA UL48 40E.SEQ  
 2798 CGGAACCTCTACGAGCGATATCAACACGAGATGGAAGAACAGCACCTGGAA UL48 40F.SEQ  
  
 2851 CGGCTAGAACGTGAATGGCAAGAAGAGGCCGGCAAGCTCACGGTAACTTC UL48 AD169.SEQ  
 2848 CGGCTAGAACGTGAATGGCAAGAAGAGGCCGGCAAGCTCACGGTAACTTC UL48 40E.SEQ  
 2848 CGGCTAGAACGTGAATGGCAAGAAGAGGCCGGCAAGCTCACGGTAACTTC UL48 40F.SEQ  
  
 2901 TGTGGAGGACGTGCAGCGTGTCTTGGCCCGGGCACCGAGCCATCGTGTCA UL48 AD169.SEQ  
 2898 TGTGGAGGACGTGCAGCGTGTCTTGGCCCGGGCACCGAGCCATCGTGTCA UL48 40E.SEQ  
 2898 TGTGGAGGACGTGCAGCGTGTCTTGGCCCGGGCACCGAGCCATCGTGTCA UL48 40F.SEQ  
  
 2951 TGCATCAAATGCAACAAACGTTAACCACCAAGATGCAAGACTTTTTTAGAC UL48 AD169.SEQ  
 2948 TGCATCAAATGCAACAAACGTTAACCACCAAGATGCAAGACTTTTTTAGAC UL48 40E.SEQ  
 2948 TGCATCAAATGCAACAAACGTTAACCACCAAGATGCAAGACTTTTTTAGAC UL48 40F.SEQ

3001 AAGGAGAAACGTA AACAGGAAGAACAGCAACGGCAGCTACTGGACGGCTA UL48 AD169.SEQ  
 2998 AAGGAGAAACGTA AACAGGAAGAACAGCAACGGCAGCTACTGGACGGCTA UL48 40E.SEQ  
 2998 AAGGAGAAACGTA AACAGGAAGAACAGCAACGGCAGCTACTGGACGGCTA UL48 40F.SEQ  
  
 3051 CCAAAAAAAGGTGCAGCAGGATTTGCAACGCGTGGTGGACGCCGTTAAGG UL48 AD169.SEQ  
 3048 CCAAAAAAAGGTGCAGCAGGATTTGCAACGCGTGGTGGACGCCGTTAAGG UL48 40E.SEQ  
 3048 CCAAAAAAAGGTGCAGCAGGATTTGCAACGCGTGGTGGACGCCGTTAAGG UL48 40F.SEQ  
  
 3101 GCGAGATGCTCTCCACCATCCCGCACCAACCACTGGAGGCCACACTCGAG UL48 AD169.SEQ  
 3098 GCGAGATGCTCTCCACCATCCCGCACCAACCACTGGAGGCCACACTCGAG UL48 40E.SEQ  
 3098 GCGAGATGCTCTCCACCATCCCGCACCAACCACTGGAGGCCACACTCGAG UL48 40F.SEQ  
  
 3151 CTGCTCTTGGGCCTAGATCAACGCGCCCAACCGCTACTAGACAAGTTCAA UL48 AD169.SEQ  
 3148 CTGCTCTTGGGCCTAGATCAACGCGCCCAACCGCTACTAGACAAGTTCAA UL48 40E.SEQ  
 3148 CTGCTCTTGGGCCTAGATCAACGCGCCCAACCGCTACTAGACAAGTTCAA UL48 40F.SEQ  
  
 3201 CCAGGACTTGCTGTTCGGCGCTGCAGCAGCTGAGCAAAAACTAGACGGGC UL48 AD169.SEQ  
 3198 CCAGGACTTGCTGTTCGGCGCTGCAGCAGCTGAGCAAAAACTAGACGGGC UL48 40E.SEQ  
 3198 CCAGGACTTGCTGTTCGGCGCTGCAGCAGCTGAGCAAAAACTAGACGGGC UL48 40F.SEQ  
  
 3251 GAATCAACGAGTGTCTGCACGGCGTGCTGACGGGTGATGTAGAGCGGCGC UL48 AD169.SEQ  
 3248 GAATCAACGAGTGTCTGCACGGCGTGCTGACGGGTGATGTAGAGCGGCGC UL48 40E.SEQ  
 3248 GAATCAACGAGTGTCTGCACGGCGTGCTGACGGGTGATGTAGAGCGGCGC UL48 40F.SEQ  
  
 3301 TGTCAACCGCACCAGAGAAGCGGCTATGCAAACCAAGCCTCGCTAAACCA UL48 AD169.SEQ  
 3298 TGTCAACCGCACCAGAGAAGCGGCTATGCAAACCAAGCCTCGCTAAACCA UL48 40E.SEQ  
 3298 TGTCAACCGCACCAGAGAAGCGGCTATGCAAACCAAGCCTCGCTAAACCA UL48 40F.SEQ  
  
 3351 CTTGGACCAAATTTTGGGTCCGCAACTTCTGATCCATGAGACGCAGCAGG UL48 AD169.SEQ  
 3348 CTTGGACCAAATTTTGGGTCCGCAACTTCTGATCCATGAGACGCAGCAGG UL48 40E.SEQ  
 3348 CTTGGACCAAATTTTGGGTCCGCAACTTCTGATCCATGAGACGCAGCAGG UL48 40F.SEQ  
  
 3401 CCCTGCAACACGCCGTCCATCAAGCGCAGTTTCATCGAGAAGTGTCAACAG UL48 AD169.SEQ  
 3398 CCCTGCAACACGCCGTCCATCAAGCGCAGTTTCATCGAGAAGTGTCAACAG UL48 40E.SEQ  
 3398 CCCTGCAACACGCCGTCCATCAAGCGCAGTTTCATCGAGAAGTGTCAACAG UL48 40F.SEQ  
  
 3451 GCGGATCCAACACTACAGCCATCACGGGCAGCGAGTTCGAGGGCGACTTTGC UL48 AD169.SEQ  
 3448 GCGGATCCAACACTACAGCCATCACGGGCAGCGAGTTCGAGGGCGACTTTGC UL48 40E.SEQ  
 3448 GCGGATCCAACACTACAGCCATCACGGGCAGCGAGTTCGAGGGCGACTTTGC UL48 40F.SEQ  
  
 3501 ACGCTACCGCAGCAGTCAACAGAAGATGGAGGAACAATTACAAGAGACTA UL48 AD169.SEQ  
 3498 ACGCTACCGCAGCAGTCAACAGAAGATGGAGGAACAATTACAAGAGACTA UL48 40E.SEQ  
 3498 ACGCTACCGCAGCAGTCAACAGAAGATGGAGGAACAATTACAAGAGACTA UL48 40F.SEQ  
  
 3551 GACAACAGATGACCGAGACTAGCGAGCGGCTAGATCGCTCGCTGCGCCAG UL48 AD169.SEQ  
 3548 GACAACAGATGACCGAGACTAGCGAGCGGCTAGATCGCTCGCTGCGCCAG UL48 40E.SEQ  
 3548 GACAACAGATGACCGAGACTAGCGAGCGGCTAGATCGCTCGCTGCGCCAG UL48 40F.SEQ  
  
 3601 GATCCCGGGAGCAGCTCCGTACGCGTGTACCCGAGAAACCCCTTCAAGGG UL48 AD169.SEQ  
 3598 GATCCCGGGAGCAGCTCCGTACGCGTGTACCCGAGAAACCCCTTCAAGGG UL48 40E.SEQ  
 3598 GATCCCGGGAGCAGCTCCGTACGCGTGTACCCGAGAAACCCCTTCAAGGG UL48 40F.SEQ  
  
 3651 TCAGGAGCTGGCGGGTTCGGATCACGCCCCGCCCGGACTTCCAGCAGC UL48 AD169.SEQ  
 3648 TCAGGAGCTGGCGGGTTCGGATCACGCCCCGCCCGGACTTCCAGCAGC UL48 40E.SEQ  
 3648 TCAGGAGCTGGCGGGTTCGGATCACGCCCCGCCCGGACTTCCAGCAGC UL48 40F.SEQ  
  
 3701 CCGTTTTCAAACGCTGCTAGATCAGCAGGCCGACGCGGCCCGGAAAGCG UL48 AD169.SEQ  
 3698 CCGTTTTCAAACGCTGCTAGATCAGCAGGCCGACGCGGCCCGGAAAGCG UL48 40E.SEQ  
 3698 CCGTTTTCAAACGCTGCTAGATCAGCAGGCCGACGCGGCCCGGAAAGCG UL48 40F.SEQ

3751 CTCAGCGACGAGGCCGATCTGCTGAATCAGAAAGTACAGACGCAGTTGCC UL48 AD169.SEQ  
 3748 CTCAGCGACGAGGCCGATCTGCTGAATCAGAAAGTACAGACGCAGTTGCC UL48 40E.SEQ  
 3748 CTCAGCGACGAGGCCGATCTGCTGAATCAGAAAGTACAGACGCAGTTGCC UL48 40F.SEQ  
  
 3801 ACAACGCGACGAGCAGCTGAGCACGGCGCAGAACCTGTGGACTGATCTGG UL48 AD169.SEQ  
 3798 ACAACGCGACGAGCAGCTGAGCACGGCGCAGAACCTGTGGACTGATCTGG UL48 40E.SEQ  
 3798 ACAACGCGACGAGCAGCTGAGCACGGCGCAGAACCTGTGGACTGATCTGG UL48 40F.SEQ  
  
 3851 TCACGCGCCACAAAATGAGCGGCGGACTGGACGTGACCACCCCGACGCC UL48 AD169.SEQ  
 3848 TCACGCGCCACAAAATGAGCGGCGGACTGGACGTGACCACCCCGACGCC UL48 40E.SEQ  
 3848 TCACGCGCCACAAAATGAGCGGCGGACTGGACGTGACCACCCCGACGCC UL48 40F.SEQ  
  
 3901 AAGGCGCTGATGGAAAAGCCGCTGGAGACACTTCGCGAGCTGTTGGGCAA UL48 AD169.SEQ  
 3898 AAGGCGCTGATGGAAAAGCCGCTGGAGACACTTCGCGAGCTGTTGGGCAA UL48 40E.SEQ  
 3898 AAGGCGCTGATGGAAAAGCCGCTGGAGACACTTCGCGAGCTGTTGGGCAA UL48 40F.SEQ  
  
 3951 AGCCACGCAACAACCTGCCGTACCTGTTCGGCGGACCGCACAGTGCCTGGA UL48 AD169.SEQ  
 3948 AGCCACGCAACAACCTGCCGTACCTGTTCGGCGGACCGCACAGTGCCTGGA UL48 40E.SEQ  
 3948 AGCCACGCAACAACCTGCCGTACCTGTTCGGCGGACCGCACAGTGCCTGGA UL48 40F.SEQ  
  
 4001 TGCTGGCCTTTTCTGGAGGAAGCCCTTTCGCAAATCACCGCGGACCCTACG UL48 AD169.SEQ  
 3998 TGCTGGCCTTTTCTGGAGGAAGCCCTTTCGCAAATCACCGCGGACCCTACG UL48 40E.SEQ  
 3998 TGCTGGCCTTTTCTGGAGGAAGCCCTTTCGCAAATCACCGCGGACCCTACG UL48 40F.SEQ  
  
 4051 CACCCGCATCACGGAAGCAGGACCCACTACCGGAACCTGCAACAGCAAGC UL48 AD169.SEQ  
 4048 CACCCGCATCACGGAAGCAGGACCCACTACCGGAACCTGCAACAGCAAGC UL48 40E.SEQ  
 4048 CACCCGCATCACGGAAGCAGGACCCACTACCGGAACCTGCAACAGCAAGC UL48 40F.SEQ  
  
 4101 GTGTCGAGAGCGCCGTGACGCTAGCGCATCAAATCGAACAAAACGCGGCCCT UL48 AD169.SEQ  
 4098 GTGTCGAGAGCGCCGTGACGCTAGCGCATCAAATCGAACAAAACGCGGCCCT UL48 40E.SEQ  
 4098 GTGTCGAGAGCGCCGTGACGCTAGCGCATCAAATCGAACAAAACGCGGCCCT UL48 40F.SEQ  
  
 4151 GTGAAAATTTTATTGCACAGCATCAAGAGGCGACTGCCAACGGCGCGTCC UL48 AD169.SEQ  
 4148 GTGAAAATTTTATTGCACAGCATCAAGAGGCGACTGCCAACGGCGCGTCC UL48 40E.SEQ  
 4148 GTGAAAATTTTATTGCACAGCATCAAGAGGCGACTGCCAACGGCGCGTCC UL48 40F.SEQ  
  
 4201 ACGCCGCGGGTTCGACATGGTCCAGGCGGTGGAAGCGCTCTGGCAGCGACT UL48 AD169.SEQ  
 4198 ACGCCGCGGGTTCGACATGGTCCAGGCGGTGGAAGCGCTCTGGCAGCGACT UL48 40E.SEQ  
 4198 ACGCCGCGGGTTCGACATGGTCCAGGCGGTGGAAGCGCTCTGGCAGCGACT UL48 40F.SEQ  
  
 4251 GGAACCCGGACGCGTAGCCGGCGGGCGCCGCGCTCATCAAAAAGTGCAGG UL48 AD169.SEQ  
 4248 GGAACCCGGACGCGTAGCCGGCGGGCGCCGCGCTCATCAAAAAGTGCAGG UL48 40E.SEQ  
 4248 GGAACCCGGACGCGTAGCCGGCGGGCGCCGCGCTCATCAAAAAGTGCAGG UL48 40F.SEQ  
  
 4301 AACTGTTGCAGCGCTTGGGTTCAGACGCTAGGCGACCTAGAACTGCAGGAA UL48 AD169.SEQ  
 4298 AACTGTTGCAGCGCTTGGGTTCAGACGCTAGGCGACCTAGAACTGCAGGAA UL48 40E.SEQ  
 4298 AACTGTTGCAGCGCTTGGGTTCAGACGCTAGGCGACCTAGAACTGCAGGAA UL48 40F.SEQ  
  
 4351 ACGTTGGCGACGGAATACTTTGCGCTGTTACACGGAATCCAGACCTTCAG UL48 AD169.SEQ  
 4348 ACGTTGGCGACGGAATACTTTGCGCTGTTACACGGAATCCAGACCTTCAG UL48 40E.SEQ  
 4348 ACGTTGGCGACGGAATACTTTGCGCTGTTACACGGAATCCAGACCTTCAG UL48 40F.SEQ  
  
 4401 CTACGGGCTGGACTTTCGGTTCGAGTTGGAAAAGATCCGCGATCTGCGGA UL48 AD169.SEQ  
 4398 CTACGGGCTGGACTTTCGGTTCGAGTTGGAAAAGATCCGCGATCTGCGGA UL48 40E.SEQ  
 4398 CTACGGGCTGGACTTTCGGTTCGAGTTGGAAAAGATCCGCGATCTGCGGA UL48 40F.SEQ  
  
 4451 CTCGTTTTGCGGAACTGGCCAAGCGACGCGGACCGCTCTCTCCAACGAG UL48 AD169.SEQ  
 4448 CTCGTTTTGCGGAACTGGCCAAGCGACGCGGACCGCTCTCTCCAACGAG UL48 40E.SEQ  
 4448 CTCGTTTTGCGGAACTGGCCAAGCGACGCGGACCGCTCTCTCCAACGAG UL48 40F.SEQ

4501 GGAGCCTGCCCAACCCCGGAAACCGCAGGCACGACTTCACTGGGCGC UL48 AD169.SEQ  
 4498 GGAGCCTGCCCAACCCACGGAAACCGCAGGCACGACTTCCCTGGGCGC UL48 40E.SEQ  
 4498 GGAGCCTGCCCAACCCACGGAAACCGCAGGCACGACTTCCCTGGGCGC UL48 40F.SEQ  
  
 4551 CTTTACACGCGGGTTGAACGCGCTGGAACGACACGTCCAGCTGGGTACC UL48 AD169.SEQ  
 4548 CTTTACACGCGGGTTGAACGCACTGGAACGACACGTCCAGCTGGGTACC UL48 40E.SEQ  
 4548 CTTTACACGCGGGTTGAACGCACTGGAACGACACGTCCAGCTGGGTACC UL48 40F.SEQ  
  
 4601 AGTATCTGCTCAACAAGCTCAACGGCTCATCGCTAGTCTATAGGCTGGAA UL48 AD169.SEQ  
 4598 AGTATCTGCTCAACAAGCTCAACGGCTCATCGCTAGTCTATAGGCTGGAA UL48 40E.SEQ  
 4598 AGTATCTGCTCAACAAGCTCAACGGCTCATCGCTAGTCTATAGGCTGGAA UL48 40F.SEQ  
  
 4651 GACATTCCCTAGCGTGCTTCCGCCAACACACGAGACCGACCCCGCGCTGAT UL48 AD169.SEQ  
 4648 GACATTCCCTAGCGTGCTTCCGCCAACACACGAGACCGACCCCGCGCTGAT UL48 40E.SEQ  
 4648 GACATTCCCTAGCGTGCTTCCGCCAACACACGAGACCGACCCCGCGCTGAT UL48 40F.SEQ  
  
 4701 AATGCGGACCGCCTGCGTCGCTATGCTTCGCGGTCACCACGACACCT UL48 AD169.SEQ  
 4698 CATGCGGACCGCCTGCGTCGCTATGCTTCGCGGTCACCACGACACCT UL48 40E.SEQ  
 4698 CATGCGGACCGCCTGCGTCGCTATGCTTCGCGGTCACCACGACACCT UL48 40F.SEQ  
  
 4751 TCTTGAAGTGGTAGACGTCTTCGGCATGCGGCAAATCGTCACGCAGGCC UL48 AD169.SEQ  
 4748 TCTTGAAGTGGTAGACGTCTTCGGCATGCGGCAAATCGTCACGCAGGCC UL48 40E.SEQ  
 4748 TCTTGAAGTGGTAGACGTCTTCGGCATGCGGCAAATCGTCACGCAGGCC UL48 40F.SEQ  
  
 4801 GGCGAACCCATTACCTGGTCACCGATTATGGCAACGTAGCCTTTAAGTA UL48 AD169.SEQ  
 4798 GGCGAACCCATTACCTGGTCACCGATTATGGCAACGTAGCCTTTAAGTA UL48 40E.SEQ  
 4798 GGCGAACCCATTACCTGGTCACCGATTATGGCAACGTAGCCTTTAAGTA UL48 40F.SEQ  
  
 4851 CTTGGCGCTGCGAGACGATGGTCGCCCCCTGGCATGGCGGCGCCGCTGTA UL48 AD169.SEQ  
 4848 CTTGGCGCTGCGAGACGATGGTCGCCCCCTGGCATGGCGGCGCCGCTGTA UL48 40E.SEQ  
 4848 CTTGGCGCTGCGAGACGATGGTCGCCCCCTGGCATGGCGGCGCCGCTGTA UL48 40F.SEQ  
  
 4901 GCGGCGGAGGACTCAAGAACGTCGTCACCACACGTTATAAAGCCATCACG UL48 AD169.SEQ  
 4898 GCGGCGGAGGACTCAAGAACGTCGTCACCACACGTTATAAAGCCATCACG UL48 40E.SEQ  
 4898 GCGGCGGAGGACTCAAGAACGTCGTCACCACACGTTATAAAGCCATCACG UL48 40F.SEQ  
  
 4951 GTAGCCGTGGCCGTCTGTGACACATTGCGCACTTCTTGCCACAGATCTC UL48 AD169.SEQ  
 4948 GTAGCCGTGGCCGTCTGTGACACATTGCGCACTTCTTGCCACAGATCTC UL48 40E.SEQ  
 4948 GTAGCCGTGGCCGTCTGTGACACATTGCGCACTTCTTGCCACAGATCTC UL48 40F.SEQ  
  
 5001 GCAGTACGACCTACGACCCCTACCTCACGCAGCATCAGAGCCACACGCACC UL48 AD169.SEQ  
 4998 GCAGTACGACCTACGACCCCTACCTCACGCAGCATCAGAGCCACACGCACC UL48 40E.SEQ  
 4998 GCAGTACGACCTACGACCCCTACCTCACGCAGCATCAGAGCCACACGCACC UL48 40F.SEQ  
  
 5051 CCGCGGAGACTCACACGTTGCATAACCTTAAGCTCTTTTGTATCTGGTG UL48 AD169.SEQ  
 5048 CCGCGGAGACTCACACGTTGCATAACCTTAAGCTCTTTTGTATCTGGTG UL48 40E.SEQ  
 5048 CCGCGGAGACTCACACGTTGCATAACCTTAAGCTCTTTTGTATCTGGTG UL48 40F.SEQ  
  
 5101 AGCACCGCCTGGCACCAGCGCATCGACACGCAGCAGGAGCTGACGGCCGC UL48 AD169.SEQ  
 5098 AGCACCGCCTGGCACCAGCGCATCGACACGCAGCAGGAGCTGACGGCCGC UL48 40E.SEQ  
 5098 AGCACCGCCTGGCACCAGCGCATCGACACGCAGCAGGAGCTGACGGCCGC UL48 40F.SEQ  
  
 5151 CGATCGCGTAGGCAGCGGCGAAGGTGGTACGTAGGGGAACAGAGACCGG UL48 AD169.SEQ  
 5148 CGATCGCGTAGGCAGCGGCGAAGGTGGTACGTAGGGGAACAGAGACCGG UL48 40E.SEQ  
 5148 CGATCGCGTAGGCAGCGGCGAAGGTGGTACGTAGGGGAACAGAGACCGG UL48 40F.SEQ  
  
 5201 GCCGCGGACCGTGCTGCGCTGAGTCTCCAAGAGTTTTGTGTACTCATA UL48 AD169.SEQ  
 5198 GCCGCGGACCGTGCTGCGCTGAGTCTCCAAGAGTTTTGTGTACTCATA UL48 40E.SEQ  
 5198 GCCGCGGACCGTGCTGCGCTGAGTCTCCAAGAGTTTTGTGTACTCATA UL48 40F.SEQ

5251 GCGGCTCTGTACCCCGAGTACATCTACACCGTCTCAAATACCCGGTGCA UL48 AD169.SEQ  
 5248 GCAAGCTCTGTACCCCGAGTACATCTACACCGTCTCAAATACCCGGTGCA UL48 40E.SEQ  
 5248 GCAAGCTCTGTACCCCGAGTACATCTACACCGTCTCAAATACCCGGTGCA UL48 40F.SEQ  
  
 5301 GATGTCACCTACCCTCCCTCACAGCTCACCTACATCAGGATGTGATACACG UL48 AD169.SEQ  
 5298 GATGTCGCTACCCTCCCTCACAGCTCACCTACATCAGGATGTAATACACG UL48 40E.SEQ  
 5298 GATGTCGCTACCCTCCCTCACAGCTCACCTACATCAGGATGTAATACACG UL48 40F.SEQ  
  
 5351 CGGTAGTCAATAACACACACAAAATGCCCCCGACCACCTCCCCGAACAG UL48 AD169.SEQ  
 5348 CGGTAGTCAATAACACACACAAAATGCCCCCGACCACCTCCCCGAACAG UL48 40E.SEQ  
 5348 CGGTAGTCAATAACACACACAAAATGCCCCCGACCACCTCCCCGAACAG UL48 40F.SEQ  
  
 5401 GTC AAGGCTTTCTGTATCACCCCCACCCAATGGCCCGCCATGCAGCTCAA UL48 AD169.SEQ  
 5398 GTC AAGGCTTTCTGTATCACCCCCACCCAATGGCCCGCCATGCAGCTCAA UL48 40E.SEQ  
 5398 GTC AAGGCTTTCTGTATCACCCCCACCCAATGGCCCGCCATGCAGCTCAA UL48 40F.SEQ  
  
 5451 TAAACTGTTTTGGGAAAATAAACTGGTACAGCAACTGTGCCAGGTAGGCC UL48 AD169.SEQ  
 5448 TAAACTGTTTTGGGAAAATAAACTGGTACAGCAACTGTGCCAGGTAGGCC UL48 40E.SEQ  
 5448 TAAACTGTTTTGGGAAAATAAACTGGTACAGCAACTGTGCCAGGTAGGCC UL48 40F.SEQ  
  
 5501 CGCAAAAAGCACACC GCCCTTAGGCAAGCTATGGCTCTACGCCATGGCC UL48 AD169.SEQ  
 5498 CGCAAAAAGCACACC ATCCCTAGGCAAGCTATGGCTCTACGCCATGGCC UL48 40E.SEQ  
 5498 CGCAAAAAGCACACC ATCCCTAGGCAAGCTATGGCTCTACGCCATGGCC UL48 40F.SEQ  
  
 5551 ACGCTGGTCTTTCCACAAGACATGCTGCAGTGTCTGTGGCTAGAACTGAA UL48 AD169.SEQ  
 5548 ACGCTGGTCTTTCCACAAGACATGCTGCAGTGTCTGTGGCTAGAACTGAA UL48 40E.SEQ  
 5548 ACGCTGGTCTTTCCACAAGACATGCTGCAGTGTCTGTGGCTAGAACTGAA UL48 40F.SEQ  
  
 5601 ACCCCAGTACGCCGAGAC ATACGCCTCGGTGTCCGAATTGGTACAGACGTT UL48 AD169.SEQ  
 5598 ACCCCAGTACGCCGAGAC CTACGCCTCGGTGTCCGAATTGGTACAGACG UL48 40E.SEQ  
 5598 ACCCCAGTACGCCGAGAC CTACGCCTCGGTGTCCGAATTGGTACAGACG UL48 40F.SEQ  
  
 5651 TGTTTCAGATTTTTCACGCAACAATGCGAATATGGTGACCGAGGGGTACACG UL48 AD169.SEQ  
 5648 TGTTTCAGATTTTTCACGCAACAATGCGAGATGGTGACCGAGGGGTACACG UL48 40E.SEQ  
 5648 TGTTTCAGATTTTTCACGCAACAATGCGAGATGGTGACCGAGGGGTACACG UL48 40F.SEQ  
  
 5701 CAACCGCAGCTCCCCACCGGAGAGCCGGTGCTTCAGATGATCCGCGTGCC UL48 AD169.SEQ  
 5698 CAACCGCAGCTCCCCACCGGAGAGCCGGTGCTTCAGATGATCCGCGTGCC UL48 40E.SEQ  
 5698 CAACCGCAGCTCCCCACCGGAGAGCCGGTGCTTCAGATGATCCGCGTGCC UL48 40F.SEQ  
  
 5751 ACGTCAAGACACAACCACCACAGACACAAAACGACCACGGAGCCGGGAC UL48 AD169.SEQ  
 5748 ACGCCAAGACACAACCACCACAGACACAAAACGACCACGGAGCCGGGAC UL48 40E.SEQ  
 5748 ACGCCAAGACACAACCACCACAGACACAAAACGACCACGGAGCCGGGAC UL48 40F.SEQ  
  
 5801 TTTTAGATGTTTTATTCAAACAGAAACCGCCCTAGACTACGCGCTGGGC UL48 AD169.SEQ  
 5798 TTTTAGATGTTTTATTCAAACAGAAACCGCCCTAGACTACGCGCTGGGC UL48 40E.SEQ  
 5798 TTTTAGATGTTTTATTCAAACAGAAACCGCCCTAGACTACGCGCTGGGC UL48 40F.SEQ  
  
 5851 TCCTGGCTTTTCGGCATAACCCGTGTGTCTCGGCGTGCACTGTAGCCGACCT UL48 AD169.SEQ  
 5848 TCCTGGCTTTTCGGCATAACCCGTGTGTCTCGGCGTGCACTGTAGCCGACCT UL48 40E.SEQ  
 5848 TCCTGGCTTTTCGGCATAACCCGTGTGTCTCGGCGTGCACTGTAGCCGACCT UL48 40F.SEQ  
  
 5901 GCTGAAAGGCCAACGTATACCTAGTAGCGGCCACCTCGAATACACGTCCG UL48 AD169.SEQ  
 5898 GCTGAAAGGCCAACGTGATTTAGTAGCGGCCACCTCGAATACACGTCCG UL48 40E.SEQ  
 5898 GCTGAAAGGCCAACGTGATTTAGTAGCGGCCACCTCGAATACACGTCCG UL48 40F.SEQ  
  
 5951 GAGACCGCGACTTCCTCCGCATCCAACGCTCCCGGACTCAATCTCAGT UL48 AD169.SEQ  
 5948 GAGACCGCGACTTCCTCCGCATCCAACGCTCCCGGACTCAATCTCAGT UL48 40E.SEQ  
 5948 GAGACCGCGACTTCCTCCGCATCCAACGCTCCCGGACTCAATCTCAGT UL48 40F.SEQ

6001 CAACTGCTCCAGGACACGTGGACCGAAACGCCGCTGGAGCACTGCTGGCT UL48 AD169.SEQ  
 5998 CAACTGCTCCAGGACACGTGGACCGAAACGCCGCTGGAGCACTGCTGGCT UL48 40E.SEQ  
 5998 CAACTGCTCCAGGACACGTGGACCGAAACGCCGCTGGAGCACTGCTGGCT UL48 40F.SEQ  
  
 6051 ACAAGCCCAAATCAGACGGCTACGCGATTACCTGCGTTTCCCCACCCGCT UL48 AD169.SEQ  
 6048 ACAAGCCCAAATCAGACGGCTACGCGATTACCTGCGTTTCCCCACCCGCT UL48 40E.SEQ  
 6048 ACAAGCCCAAATCAGACGGCTACGCGATTACCTGCGTTTCCCCACCCGCT UL48 40F.SEQ  
  
 6101 TAGAGTTTATTCCCCTAGTCATTTACAACGCACAGGACCACACCGT CGTA UL48 AD169.SEQ  
 6098 TAGAGTTTATTCCCCTAGTCATTTACAACGCACAGGACCACACCGT TGTA UL48 40E.SEQ  
 6098 TAGAGTTTATTCCCCTAGTCATTTACAACGCACAGGACCACACCGT TGTA UL48 40F.SEQ  
  
 6151 CGCGTGCTGCGACCGCCCTCCACGTTTGAACAGGACCACAGTCGGCTGGT UL48 AD169.SEQ  
 6148 CGCGTGCTGCGACCGCCCTCCACGTTTGAACAGGACCACAGTCGGCTGGT UL48 40E.SEQ  
 6148 CGCGTGCTGCGACCGCCCTCCACGTTTGAACAGGACCACAGTCGGCTGGT UL48 40F.SEQ  
  
 6201 GTTGGACGAGGCCTTCCCCACCTTCCCGCTGTATGACCAAGATGATAAC T UL48 AD169.SEQ  
 6198 GTTGGACGAGGCCTTCCCCACCTTCCCGCTGTATGACCAAGATGATAAC A UL48 40E.SEQ  
 6198 GTTGGACGAGGCCTTCCCCACCTTCCCGCTGTATGACCAAGATGATAAC A UL48 40F.SEQ  
  
 6251 CATCCGCGGACAAC ATC GCTGCGTCTGGCGCCGCTCCAACACCGCCGGTA UL48 AD169.SEQ  
 6248 CATCCGCGGACAAC GTC ACTGCGTCTGGCGCCGCTCCAACACCGCCGGTA UL48 40E.SEQ  
 6248 CATCCGCGGACAAC GTC ACTGCGTCTGGCGCCGCTCCAACACCGCCGGTA UL48 40F.SEQ  
  
 6301 CCTTTCAACCGCGT C CCAGTCAATATTCAGTTTCTGCGTGAAAACCCGCC UL48 AD169.SEQ  
 6298 CCTTTCAACCGCGT ACCAGTCAATATTCAGTTTCTGCGTGAAAACCCGCC UL48 40E.SEQ  
 6298 CCTTTCAACCGCGT ACCAGTCAATATTCAGTTTCTGCGTGAAAACCCGCC UL48 40F.SEQ  
  
 6351 ACCCATCGC C CGAGTTCAGCA C CGCCGCGCCGACATCGTCATCGAGCGG UL48 AD169.SEQ  
 6348 ACCCATCGC A CGAGTTCAGCA ACCGCCGCGCCGACATCGTCATCGAGCGG UL48 40E.SEQ  
 6348 ACCCATCGC A CGAGTTCAGCA ACCGCCGCGCCGACATCGTCATCGAGCGG UL48 40F.SEQ  
  
 6401 CCGCGGCCGCGAGACGACGACGGACAGATA C ATCACGTACAAGACGATACA UL48 AD169.SEQ  
 6398 CCGCGGCCGCGAGACGACGACGGACAGATA C ATCACGTACAAGACGATACA UL48 40E.SEQ  
 6398 CCGCGGCCGCGAGACGACGACGGACAGATA C ATCACGTACAAGACGATACA UL48 40F.SEQ  
  
 6451 TCAAGGACAGCCGACTCTGCATTAGTCTC T ACCGCCTTTGGCGGGTCCGT UL48 AD169.SEQ  
 6448 TCAAGGACAGCCGACTCTGCATTAGTCTC C ACCGCCTTTGGCGGGTCCGT UL48 40E.SEQ  
 6448 TCAAGGACAGCCGACTCTGCATTAGTCTC C ACCGCCTTTGGCGGGTCCGT UL48 40F.SEQ  
  
 6501 CTTTCAAGAAAACCG AT TGGGAGAAACACCACTATG C CGAGATGAACTTG UL48 AD169.SEQ  
 6498 CTTTCAAGAAAACCG GCTGGGAGAAACACCACTATG T CGAGATGAACTTG UL48 40E.SEQ  
 6498 CTTTCAAGAAAACCG GCTGGGAGAAACACCACTATG T CGAGATGAACTTG UL48 40F.SEQ  
  
 6551 TGGCCGTGGC C CCCGGCGCCGCGCAGCACCAGTTTCGCCTCGCCGCCTATC UL48 AD169.SEQ  
 6548 TGGCCGTGGC A CCCGGCGCCGCGCAGCACCAGTTTCGCCTCGCCGCCTATC UL48 40E.SEQ  
 6548 TGGCCGTGGC A CCCGGCGCCGCGCAGCACCAGTTTCGCCTCGCCGCCTATC UL48 40F.SEQ  
  
 6601 ACGGTGCT T ACGCAGAACGTCTCAGTGCTCTAGAAATA C TGCG C TAGT UL48 AD169.SEQ  
 6598 ACGGTGCT C ACGCAGAACGTCTCAGTGCTCTAGAAATA T TGCG A TAGT UL48 40E.SEQ  
 6598 ACGGTGCT C ACGCAGAACGTCTCAGTGCTCTAGAAATA T TGCG A TAGT UL48 40F.SEQ  
  
 6651 GCGATTGGACCTGCGACAACCTGGCGCAATCCGTACAGGACACTATTCAAC UL48 AD169.SEQ  
 6648 GCGATTGGACCTGCGACAACCTGGCGCAATCCGTACAGGACACTATTCAAC UL48 40E.SEQ  
 6648 GCGATTGGACCTGCGACAACCTGGCGCAATCCGTACAGGACACTATTCAAC UL48 40F.SEQ  
  
 6701 ACATGCGGTTTCTCTATCTTTTGTA UL48 AD169.SEQ  
 6698 ACATGCGGTTTCTCTATCTTTTGTA UL48 40E.SEQ  
 6698 ACATGCGGTTTCTCTATCTTTTGTA UL48 40F.SEQ

## 7.1.4 Anhang 4

**Aminosäuresequenzvergleich der HCMV Stämme 40 E, 40F und AD169 im offenen Leserahmen UL48.** Rot unterlegt sind die Unterschiede im Vergleich HCMV 40E/F zu HCMV AD169. Schwarz unterlegt sind die Unterschiede im Vergleich HCMV 40E zu HCMV 40F und HCMV AD169.

1	MKVTQASCHQGDIARFGARAGNQCVCNGIMFLHALHLGGTSAVLQTEALD	UL48	AD169.SEQ
1	MKVTQASCHQGDIARFGARAGNQCVCNGIMFLHALHLGGTSAVLQTEALD	UL48	40E.SEQ
1	MKVTQASCHQGDIARFGARAGNQCVCNGIMFLHALHLGGTSAVLQTEALD	UL48	40F.SEQ
151	AIMEEGARLDARLERELQKKLPAGGRLPVYRLGDEVPRRLESRFGRTVHA	UL48	AD169.SEQ
151	AIMEEGARLDARLERELQKKLPAGGRLPVYRLGDEVPRRLESRFGRTVHA	UL48	40E.SEQ
151	AIMEEGARLDARLERELQKKLPAGGRLPVYRLGDEVPRRLESRFGRTVHA	UL48	40F.SEQ
301	LSRPFNGTTETCDLDGYMCPGIFDFLRYAHAKPRPTYVLVTVNSLARAVV	UL48	AD169.SEQ
301	LSRPFNGTTETCDLDGYMCPGIFDFLRYAHAKPRPTYVLVTVNSLARAVV	UL48	40E.SEQ
301	LSRPFNGTTETCDLDGYMCPGIFDFLRYAHAKPRPTYVLVTVNSLARAVV	UL48	40F.SEQ
451	F'TEDHMLVFDPHSSAECHNAAVYHCEGLHQVLMVLTGFGVQLSPAFYYEA	UL48	AD169.SEQ
451	F'TEDHMLVFDPHSSAECHNAAVYHCEGLHQVLMVLTGFGVQLSPAFYYEA	UL48	40E.SEQ
451	F'TEDHMLVFDPHSSAECHNAAVYHCEGLHQVLMVLTGFGVQLSPAFYYEA	UL48	40F.SEQ
601	LFLYMLDVATVSEAEIAARLVSTYRDRDIDLTGVVRESADTAATTTTAAAP	UL48	AD169.SEQ
601	LFLYMLDVATVSEAEIAARLVSTYRDRDIDLTGVVRESADTAATTTTAAAP	UL48	40E.SEQ
601	LFLYMLDVATVSEAEIAARLVSTYRDRDIDLTGVVRESADTAATTTTAAAP	UL48	40F.SEQ
751	SLPPLPDPIDVPGCPPGVAPSPVYDPSSSPKKTPEKRRKDLGSGSKHGGK	UL48	AD169.SEQ
751	SLPPLPDPIDVPGCPPGVAPSPVYDPSSSPKKTPEKRRKDLGSGSKHGGK	UL48	40E.SEQ
751	SLPPLPDPIDVPGCPPGVAPSPVYDPSSSPKKTPEKRRKDLGSGSKHGGK	UL48	40F.SEQ
901	KKPPSTTSKTLATASSSSAIAAASSSSAVPPSYSCGEGALPALGRYQQL	UL48	AD169.SEQ
901	KKPPSTTSKTLATASSSSAIAAASSSSAVPPSYSCGEGALPALGRYQQL	UL48	40E.SEQ
901	KKPPSTTSKTLATASSSSAIAAASSSSAVPPSYSCGEGALPALGRYQQL	UL48	40F.SEQ
1051	VDEVEQELKALTLPPLPANTSAWTLHAAGTESGANAATATAPSFDEAFLT	UL48	AD169.SEQ
1048	VDEVEQELKALTLPPLPANTSAWTLHAAGTESGANAATATAPSFDEAFLT	UL48	40E.SEQ
1048	VDEVEQELKALTLPPLPANTSAWTLHAAGTESGANAATATAPSFDEAFLT	UL48	40F.SEQ
1201	DRLQQLI IHAVNQRSCLRRPCGPQSAQQAVRAYLGLSKKLDAFLLNWLH	UL48	AD169.SEQ
1198	DRLQQLI IHAVNQRSCLRRPCGPQSAQQAVRAYLGLSKKLDAFLLNWLH	UL48	40E.SEQ
1198	DRLQQLI IHAVNQRSCLRRPCGPQSAQQAVRAYLGLSKKLDAFLLNWLH	UL48	40F.SEQ
1351	HGLDLRMRHDYLSHKTTKGTYSTLDRALLEKMQVVFDPYGRQHGPALIAW	UL48	AD169.SEQ
1348	HGLDLRMRHDYLSHKTTKGTYSTLDRALLEKMQVVFDPYGRQHGPALIAW	UL48	40E.SEQ
1348	HGLDLRMRHDYLSHKTTKGTYSTLDRALLEKMQVVFDPYGRQHGPALIAW	UL48	40F.SEQ
1501	VEEMLRYVESKPTNELSQRLQRFVTKRPMFVSDSFVCLRPVDFQRLTQVI	UL48	AD169.SEQ
1498	VEEMLRYVESKPTNELSQRLQRFVTKRPMFVSDSFVCLRPVDFQRLTQVI	UL48	40E.SEQ
1498	VEEMLRYVESKPTNELSQRLQRFVTKRPMFVSDSFVCLRPVDFQRLTQVI	UL48	40F.SEQ
1651	EQRRRVLQRQREEYHGVEYHLAGLITSIDIHDLSDLNRRREILKALQPL	UL48	AD169.SEQ
1648	EQRRRVLQRQREEYHGVEYHLAGLITSIDIHDLSDLNRRREILKALQPL	UL48	40E.SEQ
1648	EQRRRVLQRQREEYHGVEYHLAGLITSIDIHDLSDLNRRREILKALQPL	UL48	40F.SEQ
1801	DDNAKQELFRLGNAKMLELQMDLDRSTQLLTRVHNHILNGFLPVEDLKQ	UL48	AD169.SEQ
1798	DDNAKQELFRLGNAKMLELQMDLDRSTQLLTRVHNHILNGFLPVEDLKQ	UL48	40E.SEQ
1798	DDNAKQELFRLGNAKMLELQMDLDRSTQLLTRVHNHILNGFLPVEDLKQ	UL48	40F.SEQ
1951	MERVVEQVRLRFYDLRDLKLCDSYEEGFVVIREQLSYLMTGTVRDNVPL	UL48	AD169.SEQ
1948	MERVVEQVRLRFYDLRDLKLCDSYEEGFVVIREQLSYLMTGTVRDNVPL	UL48	40E.SEQ
1948	MERVVEQVRLRFYDLRDLKLCDSYEEGFVVIREQLSYLMTGTVRDNVPL	UL48	40F.SEQ
2101	LQEILQLRHAYQQATQQNEGRLTQIHDLLHVIETLVRDPGSRGSALTAL	UL48	AD169.SEQ
2098	LQEILQLRHAYQQATQQNEGRLTQIHDLLHVIETLVRDPGSRGSALTAL	UL48	40E.SEQ
2098	LQEILQLRHAYQQATQQNEGRLTQIHDLLHVIETLVRDPGSRGSALTAL	UL48	40F.SEQ



2251 VQEQLAQLEALGGLQLPEVQORLQNAQLALSRLYEETQRFGLDGLSYD UL48 AD169.SEQ  
 2248 VQEQLAQLEALGGLQLPEVQORLQNAQLALSRLYEETQRFGLDGLSYD UL48 40E.SEQ  
 2248 VQEQLAQLEALGGLQLPEVQORLQNAQLALSRLYEETQRFGLDGLSYD UL48 40F.SEQ  
  
 2401 DPPNEQTIKRHPQLREMLRRDEQTRLRLINAVLSMFHTLVMRLARDESPR UL48 AD169.SEQ  
 2398 DPPTEQTIKRHPQLREMLRRDEQTRLRLINAVLSMFHTLVMRLARDESPR UL48 40E.SEQ  
 2398 DPPTEQTIKRHPQLREMLRRDEQTRLRLINAVLSMFHTLVMRLARDESPR UL48 40F.SEQ  
  
 2551 PTFDAVSLLLQQLPPDSHEREDLRAANATYAQMVKKLEQIEKAGTGASE UL48 AD169.SEQ  
 2548 PTFDAVSLLLQQLPPDSHEREDLRAANATYAQMVKKLEQIEKAGTGASE UL48 40E.SEQ  
 2548 PTFDAVSLLLQQLPPDSHEREDLRAANATYAQMVKKLEQIEKAGTGASE UL48 40F.SEQ  
  
 2701 KRFQALRELVYFFRNHEYFFQHMVGR LGVGPQVTELYERYQHEMEEQHLE UL48 AD169.SEQ  
 2698 KRFQALRELVYFFRNHEYFFQHMVGR LGVGPQVTELYERYQHEMEEQHLE UL48 40E.SEQ  
 2698 KRFQALRELVYFFRNHEYFFQHMVGR LGVGPQVTELYERYQHEMEEQHLE UL48 40F.SEQ  
  
 2851 RLREWQEEAGKLTVTSVEDVQRVLARAPSHRVMHQMQQTLLTTKMQDFLD UL48 AD169.SEQ  
 2848 RLREWQEEAGKLTVTSVEDVQRVLARAPSHRVMHQMQQTLLTTKMQDFLD UL48 40E.SEQ  
 2848 RLREWQEEAGKLTVTSVEDVQRVLARAPSHRVMHQMQQTLLTTKMQDFLD UL48 40F.SEQ  
  
 3001 KEKRKQEEQQRQLLDGYQKKVQODLQRVVDAVKGEMLSTIPHQPLEATLE UL48 AD169.SEQ  
 2998 KEKRKQEEQQRQLLDGYQKKVQODLQRVVDAVKGEMLSTIPHQPLEATLE UL48 40E.SEQ  
 2998 KEKRKQEEQQRQLLDGYQKKVQODLQRVVDAVKGEMLSTIPHQPLEATLE UL48 40F.SEQ  
  
 3151 LLLGLDQRAQPLLDKFNQDLLSALQQLSKKLDGRINECLHGVLTDGVERR UL48 AD169.SEQ  
 3148 LLLGLDQRAQPLLDKFNQDLLSALQQLSKKLDGRINECLHGVLTDGVERR UL48 40E.SEQ  
 3148 LLLGLDQRAQPLLDKFNQDLLSALQQLSKKLDGRINECLHGVLTDGVERR UL48 40F.SEQ  
  
 3301 CHPHREAAMQTQASLNHLQDQILGPQLLIHETQQALQHAVHQAQFIEKCQQ UL48 AD169.SEQ  
 3298 CHPHREAAMQTQASLNHLQDQILGPQLLIHETQQALQHAVHQAQFIEKCQQ UL48 40E.SEQ  
 3298 CHPHREAAMQTQASLNHLQDQILGPQLLIHETQQALQHAVHQAQFIEKCQQ UL48 40F.SEQ  
  
 3451 GDPTTAITGSEFEGDFARYRSSQOKMEEQLQETRQOMTETSERLDRSLRQ UL48 AD169.SEQ  
 3448 GDPTTAITGSEFEGDFARYRSSQOKMEEQLQETRQOMTETSERLDRSLRQ UL48 40E.SEQ  
 3448 GDPTTAITGSEFEGDFARYRSSQOKMEEQLQETRQOMTETSERLDRSLRQ UL48 40F.SEQ  
  
 3601 DPGSSSVTRVPEKPFKGQELAGRITPPPADFQQPVFKTLLDQQADAARKA UL48 AD169.SEQ  
 3598 DPGSSSVTRVPEKPFKGQELAGRITPPPADFQQPVFKTLLDQQADAARKA UL48 40E.SEQ  
 3598 DPGSSSVTRVPEKPFKGQELAGRITPPPADFQQPVFKTLLDQQADAARKA UL48 40F.SEQ  
  
 3751 LSDEADLLNQKVQTLRQRDEQLSTAQNLTDLVTRHKMSGGLDVTTPDA UL48 AD169.SEQ  
 3748 LSDEADLLNQKVQTLRQRDEQLSTAQNLTDLVTRHKMSGGLDVTTPDA UL48 40E.SEQ  
 3748 LSDEADLLNQKVQTLRQRDEQLSTAQNLTDLVTRHKMSGGLDVTTPDA UL48 40F.SEQ  
  
 3901 KALMEKPLETLRELLGKATQQLPYLSAERTVRWMLAFLEEALQITADPT UL48 AD169.SEQ  
 3898 KALMEKPLETLRELLGKATQQLPYLSAERTVRWMLAFLEEALQITTDPT UL48 40E.SEQ  
 3898 KALMEKPLETLRELLGKATQQLPYLSAERTVRWMLAFLEEALQITTDPT UL48 40F.SEQ  
  
 4051 HPHHGSRTHYRNLLQQAVESAVTLAHQIEQNAACENFIAHQEATANGAS UL48 AD169.SEQ  
 4048 HPHHGSRTHYRNLLQQAVESAVTLAHQIEQNAACENFIAHQEATANGAS UL48 40E.SEQ  
 4048 HPHHGSRTHYRNLLQQAVESAVTLAHQIEQNAACENFIAHQEATANGAS UL48 40F.SEQ  
  
 4201 TPRVDMVQAVEAVWQORLEPGRVAGGAARHQKVQELLQRLGQTLGDLELQE UL48 AD169.SEQ  
 4198 TPRVDMVQAVEAVWQORLEPGRVAGGAARHQKVQELLQRLGQTLGDLELQE UL48 40E.SEQ  
 4198 TPRVDMVQAVEAVWQORLEPGRVAGGAARHQKVQELLQRLGQTLGDLELQE UL48 40F.SEQ  
  
 4351 TLATEYFALLHGIQTFSYGLDFRSQLEKIRDRLRTRFAELAKRRGTRLSNE UL48 AD169.SEQ  
 4348 TLATEYFALLHGIQTFSYGLDFRSQLEKIRDRLRTRFAELAKRRGTRLSNE UL48 40E.SEQ  
 4348 TLATEYFALLHGIQTFSYGLDFRSQLEKIRDRLRTRFAELAKRRGTRLSNE UL48 40F.SEQ

4501 GVLPNPRKPQATTSLGAFTTRGLNALERHVQLGHQYLLNKLNGSSLVYRLE UL48 AD169.SEQ  
 4498 GALPNPRKPQATTSLGAFTTRGLNALERHVQLGHQYLLNKLNGSSLVYRLE UL48 40E.SEQ  
 4498 GALPNPRKPQATTSLGAFTTRGLNALERHVQLGHQYLLNKLNGSSLVYRLE UL48 40F.SEQ  
  
 4651 DIPSVLPATHETDPALIMRDLRRLCFARHHDTFLEVVDVFGMRQIVTQA UL48 AD169.SEQ  
 4648 DIPSVLPATHETDPALIMRDLRRLCFARHHDTFLEVVDVFGMRQIVTQA UL48 40E.SEQ  
 4648 DIPSVLPATHETDPALIMRDLRRLCFARHHDTFLEVVDVFGMRQIVTQA UL48 40F.SEQ  
  
 4801 GEPIHLVTDYGNVAFKYALALRDDGRPLAWRRRCSSGGGLKNVVTTRYKAIT UL48 AD169.SEQ  
 4798 GEPIHLVTDYGNVAFKYALALRDDGRPLAWRRRCSSGGGLKNVVTTRYKAIT UL48 40E.SEQ  
 4798 GEPIHLVTDYGNVAFKYALALRDDGRPLAWRRRCSSGGGLKNVVTTRYKAIT UL48 40F.SEQ  
  
 4951 VAVAVCQTLRTFWPQISQYDLRPYLTQHQSHTHPAETHTLHNLKLFICYLV UL48 AD169.SEQ  
 4948 VAVAVCQTLRTFWPQISQYDLRPYLTQHQSHTHPAETHTLHNLKLFICYLV UL48 40E.SEQ  
 4948 VAVAVCQTLRTFWPQISQYDLRPYLTQHQSHTHPAETHTLHNLKLFICYLV UL48 40F.SEQ  
  
 5101 STAWHQRIDTQOQELTAADRVGSGEGGDVGEQRPGRGTVLRLSLQEFVCVLI UL48 AD169.SEQ  
 5098 STAWHQRIDTQOQELTAADRVGSGEGGDVGEQRPGRGTVLRLSLQEFVCVLI UL48 40E.SEQ  
 5098 STAWHQRIDTQOQELTAADRVGSGEGGDVGEQRPGRGTVLRLSLQEFVCVLI UL48 40F.SEQ  
  
 5251 AALYPEYIYTVLKYPVQMSLPSLTAHLHQDVIAHAVNNTHKMPPDHLPEQ UL48 AD169.SEQ  
 5248 AALYPEYIYTVLKYPVQMSLPSLTAHLHQDVIAHAVNNTHKMPPDHLPEQ UL48 40E.SEQ  
 5248 AALYPEYIYTVLKYPVQMSLPSLTAHLHQDVIAHAVNNTHKMPPDHLPEQ UL48 40F.SEQ  
  
 5401 VKAFCITPTQWPAMQLNKLFWENKLVQQLCQVGPQKSTPSLGKWLWYAMA UL48 AD169.SEQ  
 5398 VKAFCITPTQWPAMQLNKLFWENKLVQQLCQVGPQKSTPSLGKWLWYAMA UL48 40E.SEQ  
 5398 VKAFCITPTQWPAMQLNKLFWENKLVQQLCQVGPQKSTPSLGKWLWYAMA UL48 40F.SEQ  
  
 5551 TLVFPQDMLQCLWLELKPQYAETYASVSELVQTLFQIFTOQCEMVTEGYT UL48 AD169.SEQ  
 5548 TLVFPQDMLQCLWLELKPQYAETYASVSELVQTLFQIFTOQCEMVTEGYT UL48 40E.SEQ  
 5548 TLVFPQDMLQCLWLELKPQYAETYASVSELVQTLFQIFTOQCEMVTEGYT UL48 40F.SEQ  
  
 5701 QPQLPTGEPVLQMIRVPRQDTTTTTDTNTTTEPGLLDVFIQTETALDYALG UL48 AD169.SEQ  
 5698 QPQLPTGEPVLQMIRVRRQDTTTTTDTNTTTEPGLLDVFIQTETALDYALG UL48 40E.SEQ  
 5698 QPQLPTGEPVLQMIRVRRQDTTTTTDTNTTTEPGLLDVFIQTETALDYALG UL48 40F.SEQ  
  
 5851 SWLFGIPVCLGVHVADLLKGQRLVARHLEYTSRDRDFLRIQRSRDLNLS UL48 AD169.SEQ  
 5848 SWLFGIPVCLGVHVADLLKGQRLVARHLEYTSRDRDFLRIQRSRDLNLS UL48 40E.SEQ  
 5848 SWLFGIPVCLGVHVADLLKGQRLVARHLEYTSRDRDFLRIQRSRDLNLS UL48 40F.SEQ  
  
 6001 QLLQDTWTETPLEHCWLQAQIRRLRDYLRFPTRLEFIPLVIYNAQDHTVV UL48 AD169.SEQ  
 5998 QLLQDTWTETPLEHCWLQAQIRRLRDYLRFPTRLEFIPLVIYNAQDHTVV UL48 40E.SEQ  
 5998 QLLQDTWTETPLEHCWLQAQIRRLRDYLRFPTRLEFIPLVIYNAQDHTVV UL48 40F.SEQ  
  
 6151 RVL RPPSTFEQDHSRLVLDEAFPTFPLYDQDDNLSADNLTASGAAPTPPV UL48 AD169.SEQ  
 6148 RVL RPPSTFEQDHSRLVLDEAFPTFPLYDQDDNLSADNLTASGAAPTPPV UL48 40E.SEQ  
 6148 RVL RPPSTFEQDHSRLVLDEAFPTFPLYDQDDNLSADNLTASGAAPTPPV UL48 40F.SEQ  
  
 6301 PFNRVPVNIQFLRENPPPIARVQOPPRRHRHRAAAAADDDGQIHHVQDDT UL48 AD169.SEQ  
 6298 PFNRVPVNIQFLRENPPPIARVQOPPRRHRHRAAAAADDDGQIHHVQDDT UL48 40E.SEQ  
 6298 PFNRVPVNIQFLRENPPPIARVQOPPRRHRHRAAAAADDDGQIHHVQDDT UL48 40F.SEQ  
  
 6451 SRTADSALVSTAFGGSVFQENRNLGETPLCRDELVAVAPGAASTSFASPPI UL48 AD169.SEQ  
 6448 SRTADSALVSTAFGGSVFQENRNLGETPLCRDELVAVAPGAASTSFASPPI UL48 40E.SEQ  
 6448 SRTADSALVSTAFGGSVFQENRNLGETPLCRDELVAVAPGAASTSFASPPI UL48 40F.SEQ  
  
 6601 TVLTQNVLSALEILRLVRLDLRQLAQSVQDTIQHMRFLYLL UL48 AD169.SEQ  
 6598 TVLTQNVLSALEILRLVRLDLRQLAQSVQDTIQHMRFLYLL UL48 40E.SEQ  
 6598 TVLTQNVLSALEILRLVRLDLRQLAQSVQDTIQHMRFLYLL UL48 40F.SEQ

### 7.1.5 Anhang 5

**Basensequenzvergleich der HCMV Stämme 40 E, 40F und AD169 im offenen Leserahmen UL32.** Rot unterlegt sind die Unterschiede im Vergleich HCMV 40E/F zu HCMV AD169. Schwarz unterlegt sind die Unterschiede im Vergleich HCMV 40E zu HCMV 40F und HCMV AD169.

1	ATGAGTTTGCAGTTTATCGGTCTACAGCGGCGCGATGTGGT	A	GCCCTGGT	UL32	AD169 .SEQ				
1	ATGAGTTTGCAGTTTATCGGTCTACAGCGGCGCGATGTGGT	G	GCCCTGGT	UL32	40E .SEQ				
1	ATGAGTTTGCAGTTTATCGGTCTACAGCGGCGCGATGTGGT	G	GCCCTGGT	UL32	40F .SEQ				
51	CAACTTTCTGCGCCATCTCACGCAAAAGCCCGACGTGGATCTCGAGGCAC			UL32	AD169 .SEQ				
51	CAACTTTCTGCGCCATCTCACGCAAAAGCCCGACGTGGATCTCGAGGCAC			UL32	40E .SEQ				
51	CAACTTTCTGCGCCATCTCACGCAAAAGCCCGACGTGGATCTCGAGGCAC			UL32	40F .SEQ				
101	ACCCCAAGATCCTGAAAAAATGTGGCGAAAAACGCCCTGCACCGGCGTACG			UL32	AD169 .SEQ				
101	ACCCCAAGATCCTGAAAAAATGTGGCGAAAAACGCCCTGCACCGGCGTACG			UL32	40E .SEQ				
101	ACCCCAAGATCCTGAAAAAATGTGGCGAAAAACGCCCTGCACCGGCGTACG			UL32	40F .SEQ				
151	GTGCTGTTCAACGAGCTCATGCTTTGGTTGGGATACTACCGCGAGCTGCG			UL32	AD169 .SEQ				
151	GTGCTGTTCAACGAGCTCATGCTTTGGTTGGGATACTACCGCGAGCTGCG			UL32	40E .SEQ				
151	GTGCTGTTCAACGAGCTCATGCTTTGGTTGGGATACTACCGCGAGCTGCG			UL32	40F .SEQ				
201	TTT	C	CACAA	C	CCCGACCTCTCCTC	A	GTGCTCGAGGAGTTCGAGGTGCGTT	UL32	AD169 .SEQ
201	TTT	C	CACAA	T	CCCGACCTCTCCTC	G	GTGCTCGAGGAGTTCGAGGTGCGTT	UL32	40E .SEQ
201	TTT	C	CACAA	T	CCCGACCTCTCCTC	G	GTGCTCGAGGAGTTCGAGGTGCGTT	UL32	40F .SEQ
251	GCG	G	GGCCGTGGCGCGT	C	CGCGGCTACACTT	A	CCCGTTCGGTGATCGTGGT	UL32	AD169 .SEQ
251	GCG	G	GGCCGTGGCGCGT	C	CGCGGCTACACTT	A	CCCGTTCGGTGATCGTGGT	UL32	40E .SEQ
251	GCG	G	GGCCGTGGCGCGT	C	CGCGGCTACACTT	A	CCCGTTCGGTGATCGTGGT	UL32	40F .SEQ
301	AAGGCGCGTGACCACCTGGCTGTGCTAGACCGTACCGAATTCGATACGGA			UL32	AD169 .SEQ				
301	AAGGCGCGTGACCACCTGGCTGTGCTAGACCGTACCGAATTCGATACGGA			UL32	40E .SEQ				
301	AAGGCGCGTGACCACCTGGCTGTGCTAGACCGTACCGAATTCGATACGGA			UL32	40F .SEQ				
351	CGTGCGCCACGATGCCGAGATCGTGGAG	A	CGCGCGCTCGTAAGCGCGGTCA	UL32	AD169 .SEQ				
351	CGTGCGCCACGATGCCGAGATCGTGGAG	G	CGCGCGCTCGTAAGCGCGGTCA	UL32	40E .SEQ				
351	CGTGCGCCACGATGCCGAGATCGTGGAG	G	CGCGCGCTCGTAAGCGCGGTCA	UL32	40F .SEQ				
401	TTCTGGCCAAGATGTCGGTGC	G	GAGACGCTGGT	C	CACAGCCATCGGCCAG	UL32	AD169 .SEQ		
401	TTCTGGCCAAGATGTCGGTGC	G	GAGACGCTGGT	C	CACAGCCATCGGCCAG	UL32	40E .SEQ		
401	TTCTGGCCAAGATGTCGGTGC	G	GAGACGCTGGT	C	CACAGCCATCGGCCAG	UL32	40F .SEQ		
451	ACGGAACCCATCGCCTTTGTGCACCTCAA	G	GATACGGAGGTGCAGCGCAT	UL32	AD169 .SEQ				
451	ACGGAACCCATCGCCTTTGTGCACCTCAA	A	GATACGGAGGTGCAGCGCAT	UL32	40E .SEQ				
451	ACGGAACCCATCGCCTTTGTGCACCTCAA	A	GATACGGAGGTGCAGCGCAT	UL32	40F .SEQ				
501	TGAAGAAAACCTGGAGGGTGTGCGCCGTAACATGTTCTG	G	GTGAAACCGC	UL32	AD169 .SEQ				
501	TGAAGAAAACCTGGAGGGTGTGCGCCGTAACATGTTCTG	T	GTGAAACCGC	UL32	40E .SEQ				
501	TGAAGAAAACCTGGAGGGTGTGCGCCGTAACATGTTCTG	T	GTGAAACCGC	UL32	40F .SEQ				
551	TCGACCTTAACCTGGACCGGCACGCCAACACGGCGCTGGTCAACGCCGTC			UL32	AD169 .SEQ				
551	TCGACCTTAACCTGGACCGGCACGCCAACACGGCGCTGGTCAACGCCGTC			UL32	40E .SEQ				
551	TCGACCTTAACCTGGACCGGCACGCCAACACGGCGCTGGTCAACGCCGTC			UL32	40F .SEQ				
601	AACAAGCTCGTGTACACGGGCGCTCTCATCATGAACGTGCG	A	AGGTCTTG	UL32	AD169 .SEQ				
601	AACAAGCTCGTGTACACGGGCGCTCTCATCATGAACGTGCG	A	AGGTCTTG	UL32	40E .SEQ				
601	AACAAGCTCGTGTACACGGGCGCTCTCATCATGAACGTGCG	A	AGGTCTTG	UL32	40F .SEQ				
651	GGAGGAGCTGGAGCGCAAATGTCTGGCGCGCATTCA	G	GAGCGCTGCAAGC	UL32	AD169 .SEQ				
651	GGAGGAGCTGGAGCGCAAATGTCTGGCGCGCATTCA	A	GAGCGCTGCAAGC	UL32	40E .SEQ				
651	GGAGGAGCTGGAGCGCAAATGTCTGGCGCGCATTCA	A	GAGCGCTGCAAGC	UL32	40F .SEQ				
701	TGCTGGTCAAGGAGCTGCGCATGTGCCTTTCCTTTGATTCCAACACTACTGT			UL32	AD169 .SEQ				
701	TGCTGGTCAAGGAGCTGCGCATGTGCCTTTCCTTTGATTCCAACACTACTGT			UL32	40E .SEQ				
701	TGCTGGTCAAGGAGCTGCGCATGTGCCTTTCCTTTGATTCCAACACTACTGT			UL32	40F .SEQ				

751 CGCAATATCCTCAAGCACGCCGTGGAAAACGGCGACTCGGCCGACACGCT UL32 AD169.SEQ  
751 CGCAATATCCTCAAGCACGCCGTGGAAAACGGCGACTCGGCCGACACGCT UL32 40E.SEQ  
751 CGCAATATCCTCAAGCACGCCGTGGAAAACGGCGACTCGGCCGACACGCT UL32 40F.SEQ  
  
801 GTTGGAGCTGCTCATCGAGGACTTTGATATCTACGTGGACAGCTTCCCAC UL32 AD169.SEQ  
801 GCTGGAGCTGCTCATCGAGGACTTTGATATCTACGTGGACAGCTTCCCAC UL32 40E.SEQ  
801 GCTGGAGCTGCTCATCGAGGACTTTGATATCTACGTGGACAGCTTCCCAC UL32 40F.SEQ  
  
851 AGTCGGCGCACACCTTTTTGGGCGCGCGCTCGCCGTCGTTGGAGTTTGAC UL32 AD169.SEQ  
851 AGTCGGCGCACACCTTTTTGGGCGCGCGCTCGCCGTCGTTGGAGTTTGAT UL32 40E.SEQ  
851 AGTCGGCGCACACCTTTTTGGGCGCGCGCTCGCCGTCGTTGGAGTTTGAT UL32 40F.SEQ  
  
901 GATGACGCCAATCTCCTCTCGCTCGGCGGCGGTTCCGCCTTCTCGTCGGT UL32 AD169.SEQ  
901 GATGACGCCAATCTCCTCTCGCTCGGCGGCGGTTCCGCCTTCTCGTCGGT UL32 40E.SEQ  
901 GATGACGCCAATCTCCTCTCGCTCGGCGGCGGTTCCGCCTTCTCGTCGGT UL32 40F.SEQ  
  
951 ACCAAGAAACATGTCCCCACGCAGCCGCTGGACGGCTGGAGCTGGATCG UL32 AD169.SEQ  
951 ACCAAGAAACATGTCCCCACGCAGCCGCTGGACGGCTGGAGCTGGATCG UL32 40E.SEQ  
951 ACCAAGAAACATGTCCCCACGCAGCCGCTGGACGGCTGGAGCTGGATCG UL32 40F.SEQ  
  
1001 CAGTCCCTGGAAGGGACACAAACCGTTCGGCTTCGAGGCCCATGGTTCT UL32 AD169.SEQ  
1001 CTAGTCCCTGGAAGGGACACAAACCGTTCGGCTTCGAGGCCCATGGTTCT UL32 40E.SEQ  
1001 CTAGTCCCTGGAAGGGACACAAACCGTTCGGCTTCGAGGCCCATGGTTCT UL32 40F.SEQ  
  
1051 CTGGCACCGGCCGCCGACGCCACGCTGCCCGTTCGGCGGCCGTCGGCTA UL32 AD169.SEQ  
1051 CTGGCACCGGCCGCCGACGCCACGCTGCCCGTTCGGCGGCCGTCGGCTA UL32 40E.SEQ  
1051 CTGGCACCGGCCGCCGACGCCACGCTGCCCGTTCGGCGGCCGTCGGCTA UL32 40F.SEQ  
  
1101 TTACGACGAAGAGGAAAAGCGTCGCGAGCGGCAGAAACGGGTGGACGACG UL32 AD169.SEQ  
1101 TTACGACGAAGAGGAAAAGCGTCGCGAGCGGCAGAAACGGGTGGACGACG UL32 40E.SEQ  
1101 TTACGACGAAGAGGAAAAGCGTCGCGAGCGGCAGAAACGGGTGGACGACG UL32 40F.SEQ  
  
1151 AGGTGGTGCAGCGTGAGAAACAGCAGCTGAAGGCTTGGGAGGAGAGGCAG UL32 AD169.SEQ  
1151 AGGTGGTGCAGCGTGAGAAACAGCAGCTGAAGGCTTGGGAGGAGAGGCAG UL32 40E.SEQ  
1151 AGGTGGTGCAGCGTGAGAAACAGCAGCTGAAGGCTTGGGAGGAGAGGCAG UL32 40F.SEQ  
  
1201 CAGAACCTGCAGCAACGTTCAGCAGCAACCACCGCCCCGGCACGTAAACC UL32 AD169.SEQ  
1201 CAGAACCTGCAGCAACGTTCAGCAGCAACCACCGCCCCGGCACGTAAACC UL32 40E.SEQ  
1201 CAGAACCTGCAGCAACGTTCAGCAGCAACCACCGCCCCGGCACGTAAACC UL32 40F.SEQ  
  
1251 GAGCGCCTCCCGGAGGCTCTTTGGCTCCAGTGCCGATGAGGACGACGACG UL32 AD169.SEQ  
1251 GAGCGCCTCCCGGAGGCTCTTTGGCTCCAGTGCCGATGAGGACGACGACG UL32 40E.SEQ  
1251 GAGCGCCTCCCGGAGGCTCTTTGGCTCCAGTGCCGATGAGGACGACGACG UL32 40F.SEQ  
  
1301 A---TGATGATGACGAGAAAAACATCTTTACGCCCATCAAGAAACCGGGA UL32 AD169.SEQ  
1301 ACCGATGATGATGACGAGAAAAACATCTTTACGCCCATCAAGAAACCGGGA UL32 40E.SEQ  
1301 ACCGATGATGATGACGAGAAAAACATCTTTACGCCCATCAAGAAACCGGGA UL32 40F.SEQ  
  
1348 ACTAGCGGCAAGGGCGCCGCTAGTGGTGGCGGTGTTTCCAGCATTTTCAG UL32 AD169.SEQ  
1351 ACTAGCGGCAAGGGCGCCGCTAGTGGTGGCGGTGTTTCCAGCATTTTCAG UL32 40E.SEQ  
1351 ACTAGCGGCAAGGGCGCCGCTAGTGGTGGCGGTGTTTCCAGCATTTTCAG UL32 40F.SEQ  
  
1398 CGGCCTGTTATCCTCGGGCAGTCAGAAACCACCAGCGGTCCCTTGAACA UL32 AD169.SEQ  
1401 CGGCCTGTTATCCTCGGGCAGTCAGAAACCACCAGCGGTCCCTTGAACA UL32 40E.SEQ  
1401 CGGCCTGTTATCCTCGGGCAGTCAGAAACCACCAGCGGTCCCTTGAACA UL32 40F.SEQ  
  
1448 TCCCGCAACAACAACAGCGTCACGCGGCTTTCAGTCTCGTCTCCCCGCAG UL32 AD169.SEQ  
1451 TCCCGCAGCAACAACAGCGTCACGCGGCTTTCAGTCTCGTCTCCCCGCAG UL32 40E.SEQ  
1451 TCCCGCAGCAACAACAGCGTCACGCGGCTTTCAGTCTCGTCTCCCCGCAG UL32 40F.SEQ

1498 GTGACCAAGGCCAGCCCGGGAAGGGTCCGTCTGGGACAGCGCGTGGGACGT UL32 AD169.SEQ  
 1501 GTGACCAAGGCCAGCCCGGGAAGGGTCCGTCTGGGACAGCGCGTGGGACGT UL32 40E.SEQ  
 1501 GTGACCAAGGCCAGCCCGGGAAGGGTCCGTCTGGGACAGCGCGTGGGACGT UL32 40F.SEQ  
  
 1548 GAGGCCGCTCACGGAGACCAGAGGGGATCTTTTCTCGGGCGACGAGGATT UL32 AD169.SEQ  
 1551 GAGGCCGCTCACGGAGACCAGAGGGGATCTTTTCTCGGGCGACGAGGATT UL32 40E.SEQ  
 1551 GAGGCCGCTCACGGAGACCAGAGGGGATCTTTTCTCGGGCGACGAGGATT UL32 40F.SEQ  
  
 1598 CCGACAGCTCGGATGGCTATCCCCCAACCGTCAAGATCCGCGTTTCACC UL32 AD169.SEQ  
 1601 CCGACAGCTCGGATGGCTATCCCCCAACCGTCAAGATCCGCGTTTCACC UL32 40E.SEQ  
 1601 CCGACAGCTCGGATGGCTATCCCCCAACCGTCAAGATCCGCGTTTCACC UL32 40F.SEQ  
  
 1648 GACACGCTGGTGGACATCACGGATACCGAGACGAGCGCCAAACCGCCCGT UL32 AD169.SEQ  
 1651 GACACGCTGGTGGACATCACGGATACCGAGACGAGCGCCAAACCGCCCGT UL32 40E.SEQ  
 1651 GACACGCTGGTGGACATCACGGATACCGAGACGAGCGCCAAACCGCCCGT UL32 40F.SEQ  
  
 1698 CACCACCGCTACAAGTTCGAGCAACCGACGTTGACGTTTCGGCGCCGGAG UL32 AD169.SEQ  
 1701 CACCACCGCTACAAGTTCGAGCAACCGACGTTGACGTTTCGGCGCCGGAG UL32 40E.SEQ  
 1701 CACCACCGCTACAAGTTCGAGCAACCGACGTTGACGTTTCGGCGCCGGAG UL32 40F.SEQ  
  
 1748 TTAACGTTCCCTGCTGGCGCCGGCGCTGCCATCCTCACGCCGACGCCTGTC UL32 AD169.SEQ  
 1751 TTAACGTTCCCTGCTGGCGCCGGCGCTGCCATCCTCACGCCGACGCCTGTC UL32 40E.SEQ  
 1751 TTAACGTTCCCTGCTGGCGCCGGCGCTGCCATCCTCACGCCGACGCCTGTC UL32 40F.SEQ  
  
 1798 AATCCTTCCACGGCCCCCGCTCCGGCCCCGACACCTACCTTCGCGGGTAC UL32 AD169.SEQ  
 1801 AATCCTTCCACGGCCCCCGCTCCGGCCCCGACACCTACCTTCGCGGGTAC UL32 40E.SEQ  
 1801 AATCCTTCCACGGCCCCCGCTCCGGCCCCGACACCTACCTTCGCGGGTAC UL32 40F.SEQ  
  
 1848 CCAAACCCCGGTCAACGGTAACTCGCCCTGGGCTCCGACGGCGCCGTTGC UL32 AD169.SEQ  
 1851 CCAAACCCCGGTCAACGGTAACTCGCCCTGGGCTCCGACGGCGCCGTTGC UL32 40E.SEQ  
 1851 CCAAACCCCGGTCAACGGTAACTCGCCCTGGGCTCCGACGGCGCCGTTGC UL32 40F.SEQ  
  
 1898 CCGGGGATATGAACCCCGCCAACCTGGCCGCGGAACGCGCGTGGGCCCTC UL32 AD169.SEQ  
 1901 CCGGGGATATGAACCCCGCCAACCTGGCCGCGGAACGCGCGTGGGCCCTC UL32 40E.SEQ  
 1901 CCGGGGATATGAACCCCGCCAACCTGGCCGCGGAACGCGCGTGGGCCCTC UL32 40F.SEQ  
  
 1948 AGAATCCTCACCTGGCTTACAATCCCTTCAGGATGCCTACGACTTCCAC UL32 AD169.SEQ  
 1951 AGAATCCTCACCTGGCTTACAATCCCTTCAGGATGCCTACGACTTCCAC UL32 40E.SEQ  
 1951 AGAATCCTCACCTGGCTTACAATCCCTTCAGGATGCCTACGACTTCCAC UL32 40F.SEQ  
  
 1998 GGCTTCTCAAACACCGTGTCCACCACCCCTCGGAGGCCGTCGACTCCAC UL32 AD169.SEQ  
 2001 GGCTTCTCAAACACCGTGTCCACCACCCCTCGGAGGCCGTCGACTCCAC UL32 40E.SEQ  
 2001 GGCTTCTCAAACACCGTGTCCACCACCCCTCGGAGGCCGTCGACTCCAC UL32 40F.SEQ  
  
 2048 GCGCCGCGGTGACACAAACAGCGTCTCGGACCCGCTGATGAGGTTTGG UL32 AD169.SEQ  
 2051 GCGCCGCGGTGACACAAACAGCGTCTCAGAACCCGCTGATGAGGTTTGG UL32 40E.SEQ  
 2051 GCGCCGCGGTGACACAAACAGCGTCTCAGAACCCGCTGATGAGGTTTGG UL32 40F.SEQ  
  
 2098 GCTTTAAGGGACCAAACCTGCAGAGTCACCGGTCGAAGACAGCGAGGAGGA UL32 AD169.SEQ  
 2101 GCTTTAAGGGACCAAACCTGCAGAGTCACCGGTCGAAGACAGCGAGGAGGA UL32 40E.SEQ  
 2101 GCTTTAAGGGACCAAACCTGCAGAGTCACCGGTCGAAGACAGCGAGGAGGA UL32 40F.SEQ  
  
 2148 AGACGACGACTCCTCGGACACCGGCTCCGTCGTCAGCCTGGGACACACAA UL32 AD169.SEQ  
 2151 AGACGACGACTCCTCGGACACCGGCTCCGTCGTCAGCCTGGGACACACAA UL32 40E.SEQ  
 2151 AGACGACGACTCCTCGGACACCGGCTCCGTCGTCAGCCTGGGACACACAA UL32 40F.SEQ  
  
 2198 CACCGTCGTCCGATTACAACAACGACGTCATTTTCGCTCCAGTCAGACG UL32 AD169.SEQ  
 2201 CACCGTCGTCCGATTACA---ACGACGTCATTTTCGCTCCAGTCAGACG UL32 40E.SEQ  
 2201 CACCGTCGTCCGATTACA---ACGACGTCATTTTCGCTCCAGTCAGACG UL32 40F.SEQ

## 7.1.6 Anhang 6

**Aminosäuresequenzvergleich der HCMV Stämme 40 E, 40F und AD169 im offenen Leserahmen UL32.** Rot unterlegt sind die Unterschiede im Vergleich HCMV 40E/F zu HCMV AD149. Schwarz unterlegt sind die Unterschiede im Vergleich HCMV 40E zu HCMV 40F und HCMV AD169.

1	MSLQFIGLQRRDVVALVNFLRHLTQKPDVDLEAHPKILKKCGEKRLHRR	UL32	AD169.SEQ
1	MSLQFIGLQRRDVVALVNFLRHLTQKPDVDLEAHPKILKKCGEKRLHRR	UL32	40E.SEQ
1	MSLQFIGLQRRDVVALVNFLRHLTQKPDVDLEAHPKILKKCGEKRLHRR	UL32	40F.SEQ
151	VLFNELMLWLGYRELRFHNPDLSSVLEEFVRCVAVARRGYTYPFGDRG	UL32	AD169.SEQ
151	VLFNELMLWLGYRELRFHNPDLSSVLEEFVRCVAVARRGYTYPFGDRG	UL32	40E.SEQ
151	VLFNELMLWLGYRELRFHNPDLSSVLEEFVRCVAVARRGYTYPFGDRG	UL32	40F.SEQ
301	KARDHLAVLDRTEFDTDVRHDAEIVERALVSAVILAKMSVRETLVTAIGQ	UL32	AD169.SEQ
301	KARDHLAVLDRTEFDTDVRHDAEIVERALVSAVILAKMSVRETLVTAIGQ	UL32	40E.SEQ
301	KARDHLAVLDRTEFDTDVRHDAEIVERALVSAVILAKMSVRETLVTAIGQ	UL32	40F.SEQ
451	TEPIAFVHLKDTEVQRIEENLEGVRRNMFCVKPLDLNDRHANTALVNAV	UL32	AD169.SEQ
451	TEPIAFVHLKDTEVQRIEENLEGVRRNMFCVKPLDLNDRHANTALVNAV	UL32	40E.SEQ
451	TEPIAFVHLKDTEVQRIEENLEGVRRNMFCVKPLDLNDRHANTALVNAV	UL32	40F.SEQ
601	NKLVYTGRIMNVRRSWEELERKCLARIQERCKLLVKELRMCLSFDSNYC	UL32	AD169.SEQ
601	NKLVYTGRIMNVRRSWEELERKCLARIQERCKLLVKELRMCLSFDSNYC	UL32	40E.SEQ
601	NKLVYTGRIMNVRRSWEELERKCLARIQERCKLLVKELRMCLSFDSNYC	UL32	40F.SEQ
751	RNILKHAVENGDSADTLELLIEDFDIYVDSFPQSAHTFLGARSPSLEFD	UL32	AD169.SEQ
751	RNILKHAVENGDSADTLELLIEDFDIYVDSFPQSAHTFLGARSPSLEFD	UL32	40E.SEQ
751	RNILKHAVENGDSADTLELLIEDFDIYVDSFPQSAHTFLGARSPSLEFD	UL32	40F.SEQ
901	DDANLLSFGGGSFAFSSVPKKHVPTQPLDGWSWIASPWKGHKPFRFEAHGS	UL32	AD169.SEQ
901	DDANLLSFGGGSFAFSSVPKKHVPTQPLDGWSWIASPWKGHKPFRFEAHGS	UL32	40E.SEQ
901	DDANLLSFGGGSFAFSSVPKKHVPTQPLDGWSWIASPWKGHKPFRFEAHGS	UL32	40F.SEQ
1051	LAPAADHAARSAAVGYDEEEKRRERQKRVDDEVVQREKQQLKAWEERQ	UL32	AD169.SEQ
1051	LAPAADHAARSAAVGYDEEEKRRERQKRVDDEVVQREKQQLKAWEERQ	UL32	40E.SEQ
1051	LAPAADHAARSAAVGYDEEEKRRERQKRVDDEVVQREKQQLKAWEERQ	UL32	40F.SEQ
1201	QNLQQRQQPPPPARKPSASRRLFSSADEDDDDDDDEKNIFTPICKPG	UL32	AD169.SEQ
1201	QNLQQRQQPPPPARKPSASRRLFSSADEDDDDDDDEKNIFTPICKPG	UL32	40E.SEQ
1201	QNLQQRQQPPPPARKPSASRRLFSSADEDDDDDDDEKNIFTPICKPG	UL32	40F.SEQ
1348	TSGKGAASGGGVSSIFSGLLSSGSQKPTSGPLNIPQQQRHAAFSLVSPQ	UL32	AD169.SEQ
1351	TSGKGAASGGGVSSIFSGLLSSGSQKPTSGPLNIPQQQRHAAFSLVSPQ	UL32	40E.SEQ
1351	TSGKGAASGGGVSSIFSGLLSSGSQKPTSGPLNIPQQQRHAAFSLVSPQ	UL32	40F.SEQ
1498	VTKASPGRVRRDSAWDVRPLTETRGLDFSGDESDSDSGYPPNRQDPRFT	UL32	AD169.SEQ
1501	VTKASPGRVRRDSAWDVRPLTETRGLDFSGDESDSDSGYPPNRQDPRFT	UL32	40E.SEQ
1501	VTKASPGRVRRDSAWDVRPLTETRGLDFSGDESDSDSGYPPNRQDPRFT	UL32	40F.SEQ
1648	DTLVDITDTETSAPPPVTAYKFEQPTLTFGAGVNPAGAGAAILTPTPV	UL32	AD169.SEQ
1651	DTLVDITDTETSAPPPVTAYKFEQPTLTFGAGVNPAGAGAAILTPTPV	UL32	40E.SEQ
1651	DTLVDITDTETSAPPPVTAYKFEQPTLTFGAGVNPAGAGAAILTPTPV	UL32	40F.SEQ
1798	NPSTAPAPAPTPTFAGTQTPVNGNSPWAPTAFLPGDMNPANWPRERAWAL	UL32	AD169.SEQ
1801	NPSTAPAPAPTPTFAGTQTPVNGNSPWAPTAFLPGDMNPANWPRERAWAL	UL32	40E.SEQ
1801	NPSTAPAPAPTPTFAGTQTPVNGNSPWAPTAFLPGDMNPANWPRERAWAL	UL32	40F.SEQ
1948	RNPHLAHPNPFMRPTTSTASQNTVSTTPRRPSTPRAAVTQTASRDAADEVW	UL32	AD169.SEQ
1951	RNPHLAHPNPFMRPTTSTASQNTVSTTPRRPSTPRAAVTQTASQNTADEVW	UL32	40E.SEQ
1951	RNPHLAHPNPFMRPTTSTASQNTVSTTPRRPSTPRAAVTQTASQNTADEVW	UL32	40F.SEQ
2098	ALRDQTAESPVEDSEEEEDDDSDTGSVVSLGHTTSPSSDYNDVISPPSQT	UL32	AD169.SEQ
2101	ALRDQTAESPVEDSEEEEDDDSDTGSVVSLGHTTSPSSDYXXDVISPPSQT	UL32	40E.SEQ
2101	ALRDQTAESPVEDSEEEEDDDSDTGSVVSLGHTTSPSSDYXXDVISPPSQT	UL32	40F.SEQ

## 8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
BPP	„basic phosphoprotein“ (UL32)
e.coli	Escherichia coli
E	„early“, früh
EDTA	Ethylendiamntetraessigsäure
ELISA	„enzyme-linked-immuno-sorbent-assay“
g	Erdbeschleunigung
gp	Glykoprotein
h	Stunde
HCMV	humanes Cytomegalievirus
HFF	„humane forskin fibroblasts“, humane Vorhautfibroblasten
HMWP	„high molecular weight protein“, UL48
HMW-BP	„high molecular weight binding protein“
HSV	Herpes simplex Virus
HUVEC	„human umbilical vene endothelial cells“, humane Nabelschnurvenen- Endothelzellen
IE	„immediate early“, sehr früh
IR <sub>L</sub>	lange interne Repetition des HCMV Genoms
IR <sub>S</sub>	kurze interne Repetition des HCMV Genoms
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
L	„late“, spät
LW	„lower matrix protein“

MCP	„major capsid protein“, Hauptkapsidprotein
mCP	„minor capsid protein“
mC-BP	„minor capsid binding protein“
min	Minute
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
ORF	„open reading frame“, offener Leserahmen
PCR	Polymerase- Kettenreaktion
PBS	„phosphate buffered saline“, Phosphatpuffer
RFLA	Restriktionsfragment- Längenanalyse
rpm	„rounds per minute“, Umdrehung pro Minute
SCP	„smallest capsid protein“, UL48/49
SSC	„standard saline citrate“
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TE	Tris-EDTA Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Amino-Methan
TR <sub>L</sub>	„long terminal repeats“, lange terminale Region des HCMV-Genoms
TR <sub>S</sub>	„short terminal repeats“, kurze terminale Region des HCMV-Genoms
ts-Mutante	temperatursensitive Mutante
U <sub>L</sub>	„unique long“, lange, nicht repetitive Region des HCMV-Genoms
UM	„upper matrix protein“
U <sub>S</sub>	„unique short“, kurze, nicht repetitive Region des HCMV-Genoms
V	Volt



## 9 Literaturverzeichnis

- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. D. Watson. (1994). In *Molecular biology of the cell*, Robertson, M. (ed): New York & London.
- Alford, C.A.B., W.J. (1990). Cytomegalovirus. In *Virology*, Fields, D.M.K.B.N. (ed) pp. 1981- 2010: New York.
- Alford, C.A.B., W.J. (1993). Cytomegalovirus. In *The human herpesviruses*, Whitley R.J., R.B., Lopez C. (ed) pp. 227- 255: New York.
- Anders, D.G. & McCue, L.A. (1996). The human cytomegalovirus genes and proteins required for DNA synthesis. *Intervirology*, **39**, 378-88.
- Arbustini, E., Grasso, M., Diegoli, M., Percivalle, E., Grossi, P., Bramerio, M., Campana, C., Goggi, C., Gavazzi, A. & Vigano, M. (1992). Histopathologic and molecular profile of human cytomegalovirus infections in patients with heart transplants. *Am J Clin Pathol*, **98**, 205-13.
- Arvin, A.M. (1997). Viral infection of the fetus and neonate. In *Viral pathogenesis*, Nathanson, N. (ed) pp. 801- 814: Philadelphia.
- Baldick, C.J., Jr. & Shenk, T. (1996). Proteins associated with purified human cytomegalovirus particles. *J Virol*, **70**, 6097-105.
- Barkholt, L.M., Ehrnst, A. & Veress, B. (1994). Clinical use of immunohistopathologic methods for the diagnosis of cytomegalovirus hepatitis in human liver allograft biopsy specimens. *Scand J Gastroenterol*, **29**, 553-60.
- Baxter, M.K. & Gibson, W. (2001). Cytomegalovirus basic phosphoprotein (pUL32) binds to capsids in vitro through its amino one-third. *J Virol*, **75**, 6865-73.
- Bechtel, J.T. & Shenk, T. (2002). Human cytomegalovirus UL47 tegument protein functions after entry and before immediate-early gene expression. *J Virol*, **76**, 1043-50.
- Britt, W.J. & Mach, M. (1996). Human cytomegalovirus glycoproteins. *Intervirology*, **39**, 401-12.
- Britt, W.J., Vugler, L., Butfiloski, E.J. & Stephens, E.B. (1990). Cell surface expression of human cytomegalovirus (HCMV) gp55-116 (gB): use of

HCMV-recombinant vaccinia virus-infected cells in analysis of the human neutralizing antibody response. *J Virol*, **64**, 1079-85.

- Brown, J.M., Kaneshima, H. & Mocarski, E.S. (1995). Dramatic interstrain differences in the replication of human cytomegalovirus in SCID-hu mice. *J Infect Dis*, **171**, 1599-603.
- Brune, W., Menard, C., Heesemann, J. & Koszinowski, U.H. (2001). A ribonucleotide reductase homolog of cytomegalovirus and endothelial cell tropism. *Science*, **291**, 303-5.
- Cha, T.A., Tom, E., Kemble, G.W., Duke, G.M., Mocarski, E.S. & Spaete, R.R. (1996). Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *J Virol*, **70**, 78-83.
- Chee, M., Rudolph, S.A., Plachter, B., Barrell, B. & Jahn, G. (1989). Identification of the major capsid protein gene of human cytomegalovirus. *J Virol*, **63**, 1345-53.
- Chen, D.H., Jiang, H., Lee, M., Liu, F. & Zhou, Z.H. (1999). Three-dimensional visualization of tegument/capsid interactions in the intact human cytomegalovirus. *Virology*, **260**, 10-6.
- Compton, T. (1995). Towards a definition of the HCMV entry pathway. *Scand J Infect Dis Suppl*, **99**, 30-2.
- Danner, S.A. (1995). Management of cytomegalovirus disease. *Aids*, **9 Suppl 2**, S3-S8.
- de Jong, M.D., Galasso, G.J., Gazzard, B., Griffiths, P.D., Jabs, D.A., Kern, E.R. & Spector, S.A. (1998). Summary of the II International Symposium on Cytomegalovirus. *Antiviral Res*, **39**, 141-62.
- Dunn, W., Chou, C., Li, H., Hai, R., Patterson, D., Stolc, V., Zhu, H. & Liu, F. (2003). Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 14223-8.
- Einsele, H., Ehninger, G., Steidle, M., Fischer, I., Bihler, S., Gerneth, F., Vallbracht, A., Schmidt, H., Waller, H.D. & Muller, C.A. (1993). Lymphocytopenia as an unfavorable prognostic factor in patients with cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation. *Blood*, **82**, 1672-8.
- Fleckenstein, B., Muller, I. & Collins, J. (1982). Cloning of the complete human cytomegalovirus genome in cosmids. *Gene*, **18**, 39-46.

- Furlong, D., Swift, H. & Roizman, B. (1972). Arrangement of herpesvirus deoxyribonucleic acid in the core. *J Virol*, **10**, 1071-4.
- Gerna, G., Zipeto, D., Percivalle, E., Parea, M., Revello, M.G., Maccario, R., Peri, G. & Milanese, G. (1992). Human cytomegalovirus infection of the major leukocyte subpopulations and evidence for initial viral replication in polymorphonuclear leukocytes from viremic patients. *J Infect Dis*, **166**, 1236-44.
- Gibson, W. (1996). Structure and assembly of the virion. *Intervirology*, **39**, 389-400.
- Gill, S.R., Schroer, T.A., Szilak, I., Steuer, E.R., Sheetz, M.P. & Cleveland, D.W. (1991). Dynactin, a conserved, ubiquitously expressed component of an activator of vesicle motility mediated by cytoplasmic dynein. *J Cell Biol*, **115**, 1639-50.
- Grefte, A., Harmsen, M.C., van der Giessen, M., Knollema, S., van Son, W.J. & The, T.H. (1994). Presence of human cytomegalovirus (HCMV) immediate early mRNA but not ppUL83 (lower matrix protein pp65) mRNA in polymorphonuclear and mononuclear leukocytes during active HCMV infection. *J Gen Virol*, **75 ( Pt 8)**, 1989-98.
- Grefte, A., van der Giessen, M., van Son, W. & The, T.H. (1993). Circulating cytomegalovirus (CMV)-infected endothelial cells in patients with an active CMV infection. *J Infect Dis*, **167**, 270-7.
- Grefte, J.M., van der Giessen, M., Blom, N., The, T.H. & van Son, W.J. (1995). Circulating cytomegalovirus-infected endothelial cells after renal transplantation: possible clue to pathophysiology? *Transplant Proc*, **27**, 939-42.
- Grefte, J.M., van der Gun, B.T., Schmolke, S., van der Giessen, M., van Son, W.J., Plachter, B., Jahn, G. & The, T.H. (1992). The lower matrix protein pp65 is the principal viral antigen present in peripheral blood leukocytes during an active cytomegalovirus infection. *J Gen Virol*, **73 ( Pt 11)**, 2923-32.
- Hahn, G., Jores, R. & Mocarski, E.S. (1998). Cytomegalovirus remains latent in a common precursor of dendritic and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 3937-42.
- Hahn, G., Revello, M.G., Patrone, M., Percivalle, E., Campanini, G., Sarasini, A., Wagner, M., Gallina, A., Milanese, G., Koszinowski, U., Baldanti, F. & Gerna, G. (2004). Human cytomegalovirus UL131-128 genes are

indispensable for virus growth in endothelial cells and virus transfer to leukocytes. *J Virol*, **78**, 10023-33.

Halwachs-Baumann, G., Wilders-Truschnig, M., Desoye, G., Hahn, T., Kiesel, L., Klingel, K., Rieger, P., Jahn, G. & Sinzger, C. (1998). Human trophoblast cells are permissive to the complete replicative cycle of human cytomegalovirus. *J Virol*, **72**, 7598-602.

Heieren, M.H., Kim, Y.K. & Balfour, H.H., Jr. (1988). Human cytomegalovirus infection of kidney glomerular visceral epithelial and tubular epithelial cells in culture. *Transplantation*, **46**, 426-32.

Hirokawa, N. (1998a). Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science*, **279**, 519-26.

Hirokawa, N., Noda, Y. & Okada, Y. (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division. *Curr Opin Cell Biol*, **10**, 60-73.

Horn, M., Schlote, W., Herrmann, G., Gungor, T. & Jacobi, G. (1992). Immunocytochemical characterization of cytomegalovirus (CMV) infected giant cells in perinatal acquired human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Acta Histochem Suppl*, **42**, 115-22.

Ibanez, C.E., Schrier, R., Ghazal, P., Wiley, C. & Nelson, J.A. (1991). Human cytomegalovirus productively infects primary differentiated macrophages. *J Virol*, **65**, 6581-8.

Irmiere, A. & Gibson, W. (1983). Isolation and characterization of a noninfectious virion-like particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus. *Virology*, **130**, 118-33.

Jahn, G., Knust, E., Schmolla, H., Sarre, T., Nelson, J.A., McDougall, J.K. & Fleckenstein, B. (1984). Predominant immediate-early transcripts of human cytomegalovirus AD 169. *J Virol*, **49**, 363-70.

Jahn, G., Kouzarides, T., Mach, M., Scholl, B.C., Plachter, B., Traupe, B., Preddie, E., Satchwell, S.C., Fleckenstein, B. & Barrell, B.G. (1987a). Map position and nucleotide sequence of the gene for the large structural phosphoprotein of human cytomegalovirus. *J Virol*, **61**, 1358-67.

Jahn, G. & Mach, M. (1990). Human cytomegalovirus phosphoproteins and glycoproteins and their coding regions. *Curr Top Microbiol Immunol*, **154**, 171-85.

- Jahn, G., Pohl, W., Plachter, B. & Hintzenstern, J. (1988). [Congenital cytomegalovirus infection with fatal outcome]. *Dtsch Med Wochenschr*, **113**, 424-7.
- Jahn, G., Scholl, B.C., Traupe, B. & Fleckenstein, B. (1987b). The two major structural phosphoproteins (pp65 and pp150) of human cytomegalovirus and their antigenic properties. *J Gen Virol*, **68 ( Pt 5)**, 1327-37.
- Jahn, G., Stenglein, S., Riegler, S., Einsele, H. & Sinzger, C. (1999). Human cytomegalovirus infection of immature dendritic cells and macrophages. *Intervirology*, **42**, 365-72.
- Kahl, M., Siegel-Axel, D., Stenglein, S., Jahn, G. & Sinzger, C. (2000). Efficient lytic infection of human arterial endothelial cells by human cytomegalovirus strains. *J Virol*, **74**, 7628-35.
- Karki, S. & Holzbaur, E.L. (1999). Cytoplasmic dynein and dynactin in cell division and intracellular transport. *Curr Opin Cell Biol*, **11**, 45-53.
- La Femina, R.L.a.H., G.S. (1980). In *Structural organisation of the DNA molecules from human cytomegalovirus*, Jaenisch, B.N.F.a.R. (ed) pp. 39-055: New York.
- Lamberson, H.V. & Dock, N.L. (1992). Prevention of transfusion-transmitted cytomegalovirus infection. *Transfusion*, **32**, 196-8.
- Landini, M.P. & Jahn, G. (2000). [The eclectic cellular tropism of cytomegalovirus]. *Pathologica*, **92**, 51-7.
- Landini, M.P., Severi, B., Badiali, L., Gonczol, E. & Mirolo, G. (1987). Structural components of human cytomegalovirus: in situ localization of the major glycoprotein. *Intervirology*, **27**, 154-60.
- Liu, B. & Stinski, M.F. (1992). Human cytomegalovirus contains a tegument protein that enhances transcription from promoters with upstream ATF and AP-1 cis-acting elements. *J Virol*, **66**, 4434-44.
- McGrail, M., Gepner, J., Silvanovich, A., Ludmann, S., Serr, M. & Hays, T.S. (1995). Regulation of cytoplasmic dynein function in vivo by the *Drosophila* Glued complex. *J Cell Biol*, **131**, 411-25.
- Mocarski, E.S. (2001). Cytomegalovirus and their replication. In *Fields' virology* pp. 2629- 2674: Philadelphia, PA.
- Modrow, S., Falke, G. (1997). In *Molekulare Virologie*: Heidelberg.

- Muhua, L., Karpova, T.S. & Cooper, J.A. (1994). A yeast actin-related protein homologous to that in vertebrate dynactin complex is important for spindle orientation and nuclear migration. *Cell*, **78**, 669-79.
- Nurminsky, D.I., Nurminskaya, M.V., Benevolenskaya, E.V., Shevelyov, Y.Y., Hartl, D.L. & Gvozdev, V.A. (1998). Cytoplasmic dynein intermediate-chain isoforms with different targeting properties created by tissue-specific alternative splicing. *Mol Cell Biol*, **18**, 6816-25.
- Pass, R.F. (1985). Epidemiology and transmission of cytomegalovirus. *J Infect Dis*, **152**, 243-8.
- Pass, R.F. (2001). Cytomegalovirus. In *Fields' virology*, Howley, D.M.K.P.M. (ed) pp. 2675- 2706: Philadelphia, PA.
- Percivalle, E., Revello, M.G., Vago, L., Morini, F. & Gerna, G. (1993). Circulating endothelial giant cells permissive for human cytomegalovirus (HCMV) are detected in disseminated HCMV infections with organ involvement. *J Clin Invest*, **92**, 663-70.
- Plachter, B., Sinzger, C. & Jahn, G. (1996). Cell types involved in replication and distribution of human cytomegalovirus. *Adv Virus Res*, **46**, 195-261.
- Pulliam, L., Berens, M.E. & Rosenblum, M.L. (1988). A normal human brain cell aggregate model for neurobiological studies. *J Neurosci Res*, **21**, 521-30.
- Quinnan, G.V., Jr., Delery, M., Rook, A.H., Frederick, W.R., Epstein, J.S., Manischewitz, J.F., Jackson, L., Ramsey, K.M., Mittal, K., Plotkin, S.A. & et al. (1984). Comparative virulence and immunogenicity of the Towne strain and a nonattenuated strain of cytomegalovirus. *Ann Intern Med*, **101**, 478-83.
- Riegler, S., Hebart, H., Einsele, H., Brossart, P., Jahn, G. & Sinzger, C. (2000). Monocyte-derived dendritic cells are permissive to the complete replicative cycle of human cytomegalovirus. *J Gen Virol*, **81**, 393-9.
- Roberts, W.H., Sneddon, J.M., Waldman, J. & Stephens, R.E. (1989). Cytomegalovirus infection of gastrointestinal endothelium demonstrated by simultaneous nucleic acid hybridization and immunohistochemistry. *Arch Pathol Lab Med*, **113**, 461-4.
- Roizman, B. (1993). The family Herpesviridae: A brief introduction. In *The Human Herpesviruses*, B. Roizman, R.J.W., C. Lopez (ed) pp. 1- 9: New York.

- Rummelt, V., Rummelt, C., Jahn, G., Wenkel, H., Sinzger, C., Mayer, U.M. & Naumann, G.O. (1994). Triple retinal infection with human immunodeficiency virus type 1, cytomegalovirus, and herpes simplex virus type 1. Light and electron microscopy, immunohistochemistry, and in situ hybridization. *Ophthalmology*, **101**, 270-9.
- Sano, N. & Izumi, K. (1991). Hepatic cytomegalovirus involvement in autopsy cases. *Acta Pathol Jpn*, **41**, 668-72.
- Schmidbauer, M., Budka, H., Ulrich, W. & Ambros, P. (1989). Cytomegalovirus (CMV) disease of the brain in AIDS and connatal infection: a comparative study by histology, immunocytochemistry and in situ DNA hybridization. *Acta Neuropathol (Berl)*, **79**, 286-93.
- Schmolke, S., Drescher, P., Jahn, G. & Plachter, B. (1995). Nuclear targeting of the tegument protein pp65 (UL83) of human cytomegalovirus: an unusual bipartite nuclear localization signal functions with other portions of the protein to mediate its efficient nuclear transport. *J Virol*, **69**, 1071-8.
- Sinzger, C., Bissinger, A.L., Viebahn, R., Oettle, H., Radke, C., Schmidt, C.A. & Jahn, G. (1999). Hepatocytes are permissive for human cytomegalovirus infection in human liver cell culture and In vivo. *J Infect Dis*, **180**, 976-86.
- Sinzger, C., Grefte, A., Plachter, B., Gouw, A.S., The, T.H. & Jahn, G. (1995). Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *J Gen Virol*, **76 ( Pt 4)**, 741-50.
- Sinzger, C. & Jahn, G. (1996). Human cytomegalovirus cell tropism and pathogenesis. *Intervirology*, **39**, 302-19.
- Sinzger, C., Kahl, M., Laib, K., Klingel, K., Rieger, P., Plachter, B. & Jahn, G. (2000). Tropism of human cytomegalovirus for endothelial cells is determined by a post-entry step dependent on efficient translocation to the nucleus. *J Gen Virol*, **81**, 3021-35.
- Sinzger, C., Knapp, J., Plachter, B., Schmidt, K. & Jahn, G. (1997). Quantification of replication of clinical cytomegalovirus isolates in cultured endothelial cells and fibroblasts by a focus expansion assay. *J Virol Methods*, **63**, 103-12.
- Sinzger, C., Plachter, B., Grefte, A., The, T.H. & Jahn, G. (1996a). Tissue macrophages are infected by human cytomegalovirus in vivo. *J Infect Dis*, **173**, 240-5.

- Sinzger, C., Plachter, B., Stenglein, S. & Jahn, G. (1993). Immunohistochemical detection of viral antigens in smooth muscle, stromal, and epithelial cells from acute human cytomegalovirus gastritis. *J Infect Dis*, **167**, 1427-32.
- Slobbe-van Drunen, M.E., Hendrickx, A.T., Vossen, R.C., Speel, E.J., van Dam-Mieras, M.C. & Bruggeman, C.A. (1998). Nuclear import as a barrier to infection of human umbilical vein endothelial cells by human cytomegalovirus strain AD169. *Virus Res*, **56**, 149-56.
- Sodeik, B., Ebersold, M.W. & Helenius, A. (1997). Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J Cell Biol*, **136**, 1007-21.
- Spector, S.A., Hirata, K.K. & Newman, T.R. (1984). Identification of multiple cytomegalovirus strains in homosexual men with acquired immunodeficiency syndrome. *J Infect Dis*, **150**, 953-6.
- Stinski, M.F. (1991). Cytomegalovirus and its replication. In *Fundamental virology*, B.N. Fields, D.M.K.e.a. (ed), Vol. Second edition. pp. 929- 950: New York.
- Tumilowicz, J.J. (1990). Characteristics of human arterial smooth muscle cell cultures infected with cytomegalovirus. *In Vitro Cell Dev Biol*, **26**, 1144-50.
- Urban, M., Klein, M., Britt, W.J., Hassfurth, E. & Mach, M. (1996). Glycoprotein H of human cytomegalovirus is a major antigen for the neutralizing humoral immune response. *J Gen Virol*, **77 ( Pt 7)**, 1537-47.
- Waldman, W.J., Roberts, W.H., Davis, D.H., Williams, M.V., Sedmak, D.D. & Stephens, R.E. (1991). Preservation of natural endothelial cytopathogenicity of cytomegalovirus by propagation in endothelial cells. *Arch Virol*, **117**, 143-64.
- Waldman, W.J., Sneddon, J.M., Stephens, R.E. & Roberts, W.H. (1989). Enhanced endothelial cytopathogenicity induced by a cytomegalovirus strain propagated in endothelial cells. *J Med Virol*, **28**, 223-30.
- Webster, A. (1991). Cytomegalovirus as a possible cofactor in HIV disease progression. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.*, **4**, 47- 52.
- Wiley, C.A. & Nelson, J.A. (1988). Role of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus in AIDS encephalitis. *Am J Pathol*, **133**, 73-81.



Ye, G.J., Vaughan, K.T., Vallee, R.B. & Roizman, B. (2000). The herpes simplex virus 1 U(L)34 protein interacts with a cytoplasmic dynein intermediate chain and targets nuclear membrane. *J Virol*, **74**, 1355-63.

## **Danksagung**

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Gerhard Jahn für die Möglichkeit die Räumlichkeiten und materielle Ressourcen des Instituts für Medizinische Virologie zu nutzen, um diese Arbeit erstellen zu können.

Herrn PD Dr. med. Christian Sinzger möchte ich für die Überlassung des Themas, für die hervorragende fachliche Betreuung, die Einführung in wissenschaftliches Denken und Arbeiten, seine Geduld und sein außergewöhnliches Engagement danken, die mich sowohl in der praktischen Durchführung als auch während des Schreibens begleitet haben.

Frau Kerstin Laib-Sampaio ohne deren Unterstützung im Labor diese Arbeit wohl deutlich mehr Zeit in Anspruch genommen hätte und die durch ihr Engagement eine exzellente Zusammenarbeit ermöglicht hat.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinen Freunden, die mich während jeder Phase meines Studiums, als auch bei der Erstellung dieser Arbeit vielfach unterstützt haben.

## Lebenslauf

### *Persönliche Daten*

Name	Susann Friedericke Autenrieth
Geburtstag	5. April 1975
Geburtsort	Nürtingen
Staatsangehörigkeit	deutsch
Eltern	Heiderose und Horst Autenrieth

### *Schulbildung*

1981-1985	Grundschule: Brühlschule Genkingen
1985-1994	Friedrich- Schiller- Gymnasium, Pfullingen Abschluss: Hochschulreife

### *Hochschulbildung*

1995-1998	Vorklinisches Studium an der Eberhard- Karls- Universität, Tübingen
1998	Vorärztliche Prüfung in Tübingen
1998-2003	Klinisches Studium in Tübingen
2000	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Studienaufenthalt in Valparasio (USA)
2002	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2002-2003	Praktisches Jahr in Esslingen und Laufen (Schweiz)
21.5.2003	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### *Berufliche Tätigkeit*

Seit 01/2004	Ässistenzärztin in der Abteilung für Innere Medizin des Städtischen Krankenhauses, Sindelfingen
--------------	--