

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Medizinische Mikrobiologie
Klinische Virologie
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. G. Peters-

**Herstellung und Charakterisierung von Fusionsproteinen aus
Green Fluorescent Protein (GFP) und Glykoprotein L (gL) von
Herpes simplex-Virus Typ 1 (HSV-1)**

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung des doctor medicinae
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms- Universität Münster

vorgelegt von
Eva Barbara Krzemien
aus Kattowitz / Polen

im Jahr 2010

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms- Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. W. Schmitz

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. J. E. Kühn

2. Berichterstatter: Priv. -Doz. Dr. V. Shahin

Tag der mündlichen Prüfung: 21.01.2010

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Medizinische Mikrobiologie
Klinische Virologie

-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. G. Peters-

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. J. E. Kühn

Koreferent: Priv. -Doz. Dr. V. Shahin

Zusammenfassung

Herstellung und Charakterisierung von Fusionsproteinen aus Green Fluorescent Protein (GFP) und Glykoprotein L (gL) von Herpes simplex-Virus Typ 1 (HSV-1)

Krzemien, Eva

Glykoprotein L (gL) von HSV-1 bildet mit Glykoprotein H (gH) einen membranständigen Komplex, welcher an der Penetration und der Zell-zu-Zellausbreitung beteiligt ist. Die Herstellung eines Fusionsproteins aus gL und EGFP (enhanced green fluorescent protein) bzw. EYFP (enhanced yellow fluorescent protein) bot die Möglichkeit, das Expressionsmuster in animalen Zellen sowie sein Verhalten bei der Virusreplikation zu untersuchen.

Hierzu wurde das mittels PCR aus dem Ausgangsvektor pEUKT7C1gL amplifizierte gL-Gen in den Vektor pEGFPgDproT7 kloniert, später wurde die EGFP-kodierende Sequenz gegen die EYFP-kodierende Sequenz ausgetauscht. Beide Konstrukte erlaubten die Expression des Fusionsproteins unter der Kontrolle des HSV-1 gD-Promotors.

Die transiente Expression der Fusionsproteine erfolgte in HeLa-Zellen. Nach der Überinfektion mit HSV-1 wiesen die Zellen eine ausgeprägte Autofluoreszenz auf, die überwiegend membranständig verteilt war. Des Weiteren wurden Zelllinien, die das grün bzw. gelb fluoreszierende Fusionsprotein stabil unter der Kontrolle des viralen Promotors exprimierten, etabliert.

Beide Fusionsproteine (ca. 65 kDA) konnten im Western-Blot mit EGFP-spezifischen monoklonalen Antikörpern nachgewiesen werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das gL-Fusionsprotein in die Virushülle eingebaut wird. Wurde die virale DNA-Synthese durch Aciclovir gehemmt, so zeigte sich keine Minderung der gLEGFP-Expression. Das zeitliche Muster der Expression entsprach somit dem eines *Early/Late-Proteins*

Tag der mündlichen Prüfung: 21.01.2010

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	1
1.1	Herpesviren	1
1.2	Epidemiologie, Klinik, Pathogenese und Therapie der Herpes simplex-Virusinfektion.....	4
1.3	Molekularbiologie des Herpes simplex-Virus.....	5
1.3.1	Aufbau des Virions.....	5
1.3.2	Adsorption, Penetration und Funktion der Glykoproteine	7
1.3.3	Regulationskaskade der Genexpression, DNA-Replikation, posttranslationale Modifikation von Glykoproteinen.....	8
1.4	Biochemie, Transport und Funktion der Glykoproteine H und L	9
1.5	Green Fluorescent Protein	10
1.6	Fragestellung.....	12
2.	Materialien	13
2.1	Viren	13
2.2	Zelllinien	13
2.3	Medium und Medienzusätze für die Zellkulturen	13
2.4	Antikörper	14
2.5	Bakterienstämme.....	14
2.6	Medien für die Bakterienkultur	14
2.7	Nukleinsäuren	15
2.8	Nukleotide, Oligonukleotide und Primer	16
2.9	Molekulargewichtstandards	17

2.10	Enzyme	17
2.11	Reagenziensysteme	18
2.12	Chemikalien/Reagenzien.....	18
2.13	Puffer.....	19
2.14	Laborbedarf	19
3.	Methoden	22
3.1	Molekularbiologische Methoden	22
3.1.1	Molekularbiologische Standardmethoden	22
3.1.2	Isolation von Plasmid-DNA	22
3.1.3	DNA-Agarosegelelektrophorese und Fragmentelution	22
3.1.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Aufreinigung von PCR- Produkten.....	23
3.2	Transformation kompetenter Bakterien	23
3.3	Zellkulturtechniken.....	24
3.3.1	Zellkultur	24
3.3.2	Transfektion von Zellen.....	24
3.3.3	Selektion von positiven Zellen nach der Transfektion.....	25
3.4	Arbeiten mit Viren	25
3.4.1	Herstellung eines Standardviruspools	25
3.4.2	Plaqueassay zur Bestimmung der Infektiosität von HSV-1	25
3.4.3	Aufkonzentrierung der Viruspartikel.....	26
3.5	Techniken zur Proteindetektion	26
3.5.1	Lyse der Zellen	26
3.5.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	27
3.5.3	Western-Blot und Immunopräzipitation	27

3.6	In vitro Transkription/Translation	29
4.	Ergebnisse	30
4.1	Klonierung von pEGFPgDProT7GI	30
4.1.1	In vitro-Transkription/-Translation von gL aus dem Ausgangsvektor pEUKC1T7gL	30
4.1.2	In vitro-Transkription/-Translation von gL aus pEUKC1T7gL unter Zugabe von Hundepankreas-mikrosomen	31
4.1.3	Optimierung der Detektion über den Einbau von Bio-Lysin	32
4.2	PCR-Amplifikation von gL	33
4.3	Klonierung des PCR-Fragmentes in pGEM-T	35
4.4	Klonierung von gL in pEGFP-1gDproT7	35
4.5	Klonierung des Plasmids pEYFPgDproT7gL	36
4.6	Transiente Expression der Konstrukte in animalen Zellen	38
4.6.1	Expressionsmuster in HeLa-Zellen	38
4.7	Etablierung von Vero-Zelllinien mit induzierbarer Expression der Fusionsproteine	39
4.7.1	Herstellung von Vero-gLEGFP-Zellen	39
4.7.2	Herstellung von Vero-gLEYFP-Zellen	40
4.7.3	Nachweis der gLEGFP- und gLEYFP-Fusionsproteine im Western-Blot	41
4.7.4	Untersuchung der Zeitkinetik der Fusionsproteinexpression	43
4.7.5	Nachweis der Fusionsproteine in Viruspartikeln	45
4.7.6	Kopräzipitation von gLEYFP mit dem gH-spezifischen monoklonalen Antikörper LP11	46

5.	Diskussion.....	48
5.1	Posttranslationale Modifikation von gL.....	48
5.2	Komplexbildung mit gH.....	49
5.3	Zeitlicher Verlauf der Expression.....	50
5.4	Verteilungsmuster des Fusionsproteins.....	51
5.5	Inkorporation des Fusionsproteins in Viruspartikel.....	53
5.6	Intrazellulärer Transport von Virionen und Ausblick.....	53
6.	Zusammenfassung.....	56
7.	Literaturverzeichnis.....	57
8.	Danksagung.....	69
9.	Lebenslauf.....	70

ABBILDUNG- UND TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Humanpathogene Herpesviren.....	3
Abbildung 2:	HSV-1-Genom und vier Genomisomere.....	6
Abbildung 3:	Nachweis von Glycoprotein L aus dem In vitro Transkriptions/Translationsprodukt des Vektors pEUKC1T7gL mit gL- spezifischem polyklonalem Kaninchenserum E24/7	30
Abbildung 4:	Modifizierung des Molekulargewichts von Glycoprotein L durch Zugabe von Hundepankreas-mikrosomen zum In vitro-Transkription/ Translationsansatz	31
Abbildung 5:	Detektion von gL über den Einbau von biotiniertem Lysin mit Streptavidin-AP.....	33
Abbildung 6:	Agarosegelelektrophorese des PCR-Produkts pEUKC1T7gL.....	34
Abbildung 7:	Agarosegelelektrophorese des Doppelverdaus von pGEM-TgL mit EcoRI und BamHI.....	35
Abbildung 8:	Agarosegelelektrophorese des mit BamHI und EcoRI geschnittenen pEGFPgDproT7gL.....	36
Abbildung 9:	Agarosegelelektrophorese des mit BamHI und EcoRI geschnittenen pEYFPgDproT7gL	38
Abbildung 10:	Transiente Expression von pEGFPgDproT7gL in HeLa-Zellen.....	45
Abbildung 11:	Stabile Expression von pEGFPgDproT7gL in Vero-Zellen.....	46
Abbildung 12:	Nachweis des Fusionsproteins gLEGFP in der Zelllinie 4.9C mit und ohne Infektion mit HSV-1 (stabile Expression). Detektion mit monoklonalen GFP-spezifischen Antikörpern	42
Abbildung 13:	Nachweis des Fusionsproteins gLEYFP in der Zelllinie 4.10A nach Infektion mit HSV-1 (transiente Expression). Detektion mit monoklonalen GFP-spezifischen Antikörpern.....	42
Abbildung 14:	Zeitkinetik der Fusionsproteinexpression nach der Infektion der Zellen mit HSV-1 jeweils mit und ohne Zugabe von Aciclovir	44
Abbildung 15:	Viruspellet aus gLEYFP-exprimierenden Zellen, welche mit HSV-1 infiziert wurden	45
Abbildung 16:	Nachweis von gLEYFP mit GFP-spezifischem monoklonalem Antikörper im Viruspellet.....	46
Abbildung 17:	Nachweis der Komplexbildung zwischen gLEYFP und gH durch Kopräzipitation mit gH-spezifischem monoklonalem Antikörper LP11 und Detektion mit GFP-spezifischem Antikörper.....	47

Abkürzungsverzeichnis

ACV	Aciclovir
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
Ak	Antikörper
As	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CMV	Cytomegalievirus
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	enhanced green fluorescent protein
ER	endoplasmatisches Reticulum
EYFP	enhanced yellow fluorescent protein
FCS	fetal calf serum
gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL, gM	Glykoproteine von HSV
HHV-6, HHV-7, HHV-8	Humanes Herpesvirus 6,7,8
HSV-1, HSV-2	Herpes simplex -Virus Typ 1, 2
IE-Proteine	Immediate Early-Proteine
ICP	Infected Cell Polypeptide
IgG, IgM	Immunglobulin G, M
kb	Kilobasen
MEM	Minimal Essential Medium
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pfu	plaque forming unit
PNS	peripheres Nervensystem
SDS	Natriumdidecylsulfat
TBS	Trisgepufferte Kochsalzlösung
U	Unit
UL	unique long
US	unique short
VP	Virusprotein
VZV	Varizelle-Zoster-Virus
WB	Westernblot
wt	wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1. Herpesviren

Das Herpes simplex-Virus Typ 1 (HSV-1), mit dem sich die folgende Arbeit beschäftigt, gilt als Prototyp der Herpes-Subfamilie der Alphaherpesviren, einer morphologisch weitgehend einheitlichen Gruppe von DNA-Viren (64, 104). Das Virion der Herpesviridae besteht aus einem 90-120 nm großen ikosaderischen Nukleokapsid, das einen ca. 75 nm großen Kern („Core“) enthält, Tegument und Lipidmembranhülle. Dieser Aufbau ist charakteristisch für alle Familienmitglieder. Herpesviren sind bei Mensch und Tier weit verbreitet. Aufgrund ihres Wachstumsverhaltens und ihres Zelltropismus lassen sie sich in drei Subfamilien unterteilen, die als Alpha-, Beta- und Gammaherpesviren bezeichnet werden (106). Vertreter derselben Subfamilie weisen neben gemeinsamen Wirtszellspektrum Homologien in ihrer DNA-Sequenz, der Anordnung von Genblöcken und serologische Kreuzreaktionen auf (44).

Viele Herpesviren erreichen sehr hohe Durchsuchungsraten in der Bevölkerung ($\geq 90\%$). Typisch für Herpesviren ist ihre Fähigkeit, lebenslang im Organismus latent zu persistieren. Tabelle 1 gibt einen Überblick der Herpesvirus-Subfamilien und der mit ihnen assoziierten Erkrankungen. Alphaherpesviren sind schnell wachsende, zytolytische Viren mit meist breitem Wirtszellspektrum. Von den zur Zeit bekannten Herpesviren gehören die beiden Herpes simplex-Viren HSV-1 und HSV-2 (112, 113, 126) sowie das Varizella-Zoster-Virus (126) zu dieser Subgruppe. HSV-1 und HSV-2 infizieren Schleimhäute und gelangen über die sensiblen Nervenfasern in die zugehörigen Nervenzellganglien des peripheren Nervensystems (PNS) (81). Dort können sie im latenten Zustand verbleiben und später endogene Rezidivinfektionen verursachen (131). Die Reaktivierung des Virus kann durch verschiedene Faktoren ausgelöst werden, wie z.B. Infekte, Immunschwäche oder Sonnenbestrahlung und als rezidivierender Herpes labialis verlaufen, bei immunsupprimierten Patienten (AIDS-, Transplantationspatienten) kann es zu schweren, generalisierten Verläufen kommen (12, 13, 36, 37). Das Krankheitsbild kann dabei durchaus unterschiedlich ausfallen, wie bei Varizella-Zoster-Virus, welches bei der Erstinfektion Windpocken, bei der Reinfektion aber *Herpes Zoster* verursacht. Betaherpesviren besitzen ein

deutlich eingeschränktes Wirtszellspektrum, ihre replikativen Zyklen sind länger und die zytopathogenen Effekte geringer. Das humane Zytomegalievirus (CMV) (110), das humane Herpesvirus Typ 6 (HHV-6) (83) und das humane Herpesvirus Typ7 (HHV-7) (49) werden der Gruppe der Betaherpesviren zugeordnet. Bei der Zytomegalie verläuft die Erstinfektion in der Regel inapparent und das Virus bleibt anschließend in lymphoiden Zellen latent. HHV-6 verursacht bei Kindern das „Dreitagefieber“ (*Exanthema subitum*, *Roseola infantum*). Vertreter der Gammaherpesviren besitzen einen noch stärker eingengten Wirtsbereich und sind nur in der Lage, bereits stark differenzierte Zellen wie lymphoblastoide Zellen zu infizieren (88).

Die Gruppe der Gammaherpesviren umfasst das Epstein-Barr-Virus (EBV) (42) und das humane Herpesvirus Typ 8 (HHV-8) (22). Eine Primärinfektion mit Epstein-Barr-Virus im Kindesalter verläuft meist asymptomatisch, bei Erwachsenen als infektiöse Mononukleose (Pfeiffersches Drüsenfieber). Für das EBV und das verwandte HHV 8 konnte ein Zusammenhang mit malignen Tumorerkrankungen nachgewiesen werden. Das EBV ist mit dem Burkitt-Lymphom und dem Nasopharynx-Karzinom assoziiert, das verwandte HHV-8 mit dem Kaposi-Sarkom (42, 92).

Humane Herpesviren	Subfamilie	Genom-Größe (kbp)	Auswahl einiger typischer, virusassoziierter Erkrankungen
Herpes simplex-Virus Typ 1 (HSV-1)	α	152	Herpes labialis, Herpesvirus-enzephalitis, HSV-Keratitis
Herpes simplex-Virus Typ 2 (HSV-2)	α	152	Genitale Infektionen, Herpes neonatorum, Meningitis
Varizella-Zoster-Virus (VZV)	α	125	Windpocken, Gürtelrose
Epstein-Barr-Virus (EBV)	γ	172	Infektiöse Mononukleose
Zytomegalievirus (CMV)	β	229	Meist asymptomatisch bei immunkompetenten Personen, lebensbedrohliche generalisierte Infekte bei Neugeborenen und immunsupprimierten Personen
Humanes Herpesvirus 6 (HHV-6 A, B)	β	162	Exanthema subitum (Dreitagefieber)
Humanes Herpesvirus 7 (HHV-7)	β	145	Infektion des lymphatischen Systems
Humanes Herpesvirus 8 (HHV-8)	γ	170	Kaposi-Sarkom

Tabelle 1: Humanpathogene Herpesviren

1.2. Epidemiologie, Klinik, Pathogenese und Therapie der Herpes simplex Virusinfektion

Die Infektion mit dem Herpes simplex-Virus ist eine der häufigsten Virusinfektionen des Menschen (11, 12, 113, 134). Der Durchseuchungsgrad, der vom sozioökonomischen Status abhängig ist, steigt im Erwachsenenalter bis zu 90 % und höher. Die Erstinfektion mit HSV-1 findet meist früh im Kindesalter statt. Die Eintrittspforte ist normalerweise die Mundschleimhaut. Die Infektion kann inapparent (ca. 90 % der Fälle) oder apparent verlaufen, wobei sie sich dann meist als Gingivostomatitis äußert. Die Viren wandern anschließend entlang der Axone in das PNS, wo sie im *Ganglion trigeminale* latent bleiben. Nach der Reaktivierung gelangen sie auf dem gleichen Weg in die Peripherie, wo sie ein bläschenförmiges Exanthem verursachen (78). Beim Herpes genitalis (93), der meist durch HSV-2 verursacht und durch Geschlechtsverkehr übertragen wird, beträgt die Durchseuchung der mitteleuropäischen Bevölkerung etwa 10-20 %. Die Infektion kann ebenfalls apparent oder inapparent verlaufen und findet üblicherweise im Urogenitaltrakt statt. HSV-2 bleibt in den Lumbosakralganglien latent. Gefürchtet wegen ihrer hohen Letalität ist die Infektion des Neugeborenen (Herpes neonatorum) bei Herpes genitalis der Mutter (25, 92).

Einem intakten Abwehrsystem gelingt es in der Regel, die weitere Ausbreitung des Virus einzudämmen. Zunächst wird die Immunreaktion durch Makrophagen, Granulozyten und natürliche Killer-Zellen vermittelt (10, 60).

Nach 3-4 Tagen kommt die spezifische humorale und zelluläre Immunantwort hinzu (31, 50, 51, 90, 129).

Zur Therapie der HSV-Infektionen werden Virostatika eingesetzt (33, 102). Aciclovir ist ein gut verträgliches, selektiv auf infizierte Zellen wirkendes Virostatikum, das auch bei VZV-Infektionen eingesetzt wird (94, 123). Das Nucleosidanalogue Aciclovir (ACV) wird durch die virale Thymidinkinase (selektiv in virusinfizierten Zellen) zum ACV-Monophosphat und durch zelluläre Kinasen zum ACV-Triphosphat phosphoryliert. ACV-Triphosphat ist ein Strukturanalogue des Desoxyguanosin-Triphosphats und wird an dessen Stelle in das Virusgenom eingebaut. Dieses führt zum Kettenabbruch bei der Synthese der Virus-DNA. Zusätzlich hemmt ACV-Triphosphat die virale DNA-Polymerase, wodurch es

zum Abbruch der viralen DNA-Synthese kommt. Es gibt inzwischen einige weitere Nucleosidanaloga. Valaciclovir (Prodrug von Aciclovir) und Famciclovir (Prodrug von Penciclovir) weisen eine bessere Bioverfügbarkeit bei oraler Gabe auf (103, 100). Ganciclovir ist ein in dem Wirkmechanismus dem Aciclovir ebenfalls ähnliches Virustatikum. Ganciclovir wirkt gegen alle Herpesviren. Aufgrund seiner relativ hohen Toxizität bleibt die Anwendung jedoch der Behandlung von lebensbedrohlichen CMV-Infektionen vorbehalten (40). Foscavir kann bei Resistenz von HSV, VZV und CMV alternativ eingesetzt werden. Als Pyrophosphat analogon hemmt es die virale DNA-Polymerase direkt (100). Brivudin ist eines der potentesten Nucleosidanaloga, die die Replikation von VZV hemmen. In virusinfizierten Zellen wird Brivudin zu Brivudin-Triphosphat umgewandelt, welches für die Hemmung der viralen Replikation verantwortlich ist (32). Cidofovir ist ein Cytidin-Analogon mit Aktivität gegen HSV-1, HSV-2 und CMV (5). Der aktive intrazelluläre Metabolit, Cidofovir-Diphosphat hemmt die DNA-Polymerase. Im Gegensatz zu Ganciclovir ist der Metabolismus von Cidofovir nicht von der viralen Infektion abhängig. Es wird zur Behandlung der Cytomegalie-Retinitis bei Patienten mit erworbenem Immundefekt-Syndrom (AIDS) eingesetzt. Das Medikament kann bei CMV-Stämmen wirksam sein, die auf Ganciclovir resistent sind.

1.3. Molekularbiologie des Herpes simplex Virus

1.3.1 Aufbau des Virions

Das Herpes simplex-Virus besteht wie die anderen Familienmitglieder aus einem Kern (core), Kapsid, Tegument und einer lipidhaltigen Hülle (64). Dabei ist der Kern die innerste Struktur, die von den anderen konzentrisch umgeben wird. Die Core-Struktur enthält als dichtgepackten Komplex das ca. 150 kb (100×10^6 Dalton) große HSV-Genom, welches ein lineares doppelsträngiges DNA-Molekül ist (8, 9). Es besteht aus invers angeordneten, repetitiven Genomabschnitten, die nichtrepetitive Abschnitte umschließen. In den nichtrepetitiven Regionen lassen sich ein langer, UL (unique long region (126 kbp)) und ein kürzerer Bereich, US (unique short region (26 kbp)), nachweisen (105). Kurze inver-

tierte, jeweils zueinander homologe Genombereiche (mit a,b und c bezeichnet) begrenzen die nichtrepetitiven Abschnitte. Die UL- und die US-Region können ihre Orientierung zueinander verändern, so dass es vier Isomere des HSV-Genoms gibt (114).

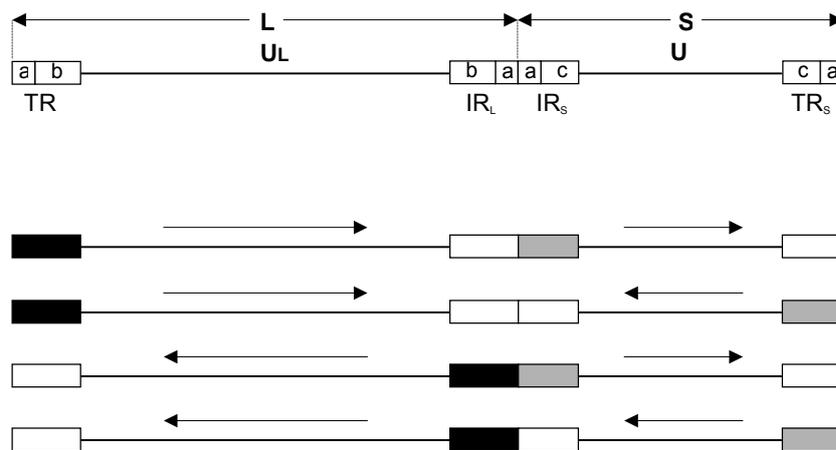


Abbildung 2: HSV-1-Genom und vier Genomisomere

TR - *terminal repeat*, IR – *internal repeat*, U_L - *unique long*, U_S - *unique short*. Pfeile zeigen umgekehrte Orientierung homologer DNA-Sequenzen

Das den Kern umgebende Kapsid hat einen Durchmesser von 88-110 nm und besteht aus 162 röhrenförmigen Kapsomeren, die zusammen eine ikosaedrische Struktur bilden. Zwischen Kapsid und Membranhülle liegt das Tegument, das aus elektronenmikroskopisch unstrukturiertem Material besteht. Die äußere Virushülle wird von einer Lipiddoppelschicht gebildet, in die zahlreiche Glykoproteine eingelagert sind. Die bisher gefundenen Glykoproteine wurden entsprechend der Reihenfolge ihrer Entdeckung gB, gC, gD, gE, gH, gI, gJ, gK, gL und gM benannt (1, 6, 17, 48, 61, 66, 70, 75, 107, 111, 119, 135).

Als integrale Membranproteine verfügen diese Glykoproteine über eine N-terminale abspaltbare hydrophobe Sequenz, das Signalpeptid, welches das Protein das endoplasmatische Retikulum passieren lässt. Weiterhin besitzen sie mit Ausnahme von gL mindestens eine C-terminale hydrophobe Sequenz, die als Transmembransequenz dient. Die Transmembransequenz unterteilt die Glykoproteine in die meist kurze C-terminale intrazytoplasmatische und die relativ lange N-terminale extrazytoplasmatische Domäne. Durch Prozessierung im ER und Golgi-Apparat werden die Glykoproteine durch Verknüpfung mit Oligosaccharidketten, Sulfat- und Fettsäureresten modifiziert (19, 69, 77, 90, 119).

1.3.2. Adsorption, Penetration und Funktion der Glykoproteine

Die Replikation von HSV beginnt mit der Adsorption des Virus an die Zelloberfläche. Anschließend folgt ein irreversibles Verschmelzen von Virushülle und Zytoplasmamembran unter Freisetzung von Nukleokapsid und Tegumentproteinen ins Zytoplasma (Penetration). Diese Vorgänge werden durch die viralen Glykoproteine vermittelt. Glykoprotein C interagiert bei der Anlagerung an die Zelloberfläche mit einem Glycosaminoglycan, dem Heparansulfat und bewirkt so eine Bindung. Glykoprotein B (gB) bindet ebenfalls an die Heparansulfatmoleküle, während gD eine stabile Bindung mit Zelloberflächenproteinen eingeht (67, 115, 133). Einige dieser Zelloberflächenproteine wurden bereits näher charakterisiert. Der herpesvirus entry mediator A (HveA/HVEM/TNFRSF14) gehört der Tumornekrosefaktor-Alpha-Rezeptorfamilie an. Nectin-1 (HveC, PRR1, CD111) und Nectin-2 (HveB, PRR2, CD112) sind Vertreter der Immunglobulin-Superfamilie (20, 48, 107, 113). Heparansulfat kann nach seiner Modifikation durch die D-Glucosaminyl-3-O-Sulfotransferase HveA und Nectin-1 funktionell ersetzen und über Interaktion mit gD den Viruseintritt in die Zelle vermitteln (52, 116). Am Ende ist die Adsorption mit einer Konformationsänderung von gD verbunden. Das Zusammenspiel der verschiedenen viralen Glykoproteine mit der Zelloberfläche bewirkt letzten Endes ein irreversibles Verschmelzen der Zellmembran mit der Virushülle und Penetration des Virus ins Zellinnere (82).

Für die in vitro Infektion sind die Glykoproteine gB ,gD und der Heterokomplex aus gH und gL essentiell (4, 16, 34, 52, 70, 89). Diese Glykoproteine spielen auch bei der Zell-zu-Zell Ausbreitung eine Rolle. gD dient als Trigger der Fusion. Initial bindet gD an den zellulären Rezeptor. Es folgt eine Interaktion zwischen gD und gB ohne Beteiligung von gH/gL. Danach erst folgt die Interaktion mit gH/gL. Der Komplex mit der Reihenfolge Rezeptor-gD-gB-gH/gL ist transient nach einer Zeitspanne von 15-30 Minuten nach Virusexposition der Zelle nachweisbar (56). Ebenfalls beteiligt sind bei der Zell-zu-Zell Ausbreitung die Glykoproteine gE, gI und gM (29). Glykoprotein C, ein für das Wachstum in vitro nicht essentielles Glykoprotein, besitzt die Fähigkeit zur Bindung des Faktors C3b des Komplementsystems und somit zur Unterbrechung der Komplementkaskade (50, 51, 53).

Der Komplex der Glykoproteine gE und gI bindet den F_c-Anteil von IgG und kann hierdurch die Antikörper-vermittelte Immunität des Wirtes aufheben. Gegen den Komplex aus gH und gL werden vom Wirtsorganismus neutralisierende Antikörper gebildet (84, 97). Untersuchungen zur Antigenität von gH ohne gL zeigten, dass das Protein fehlgefaltet und nicht an der Zelloberfläche exprimiert wurde. Nur der gH/gL-Heterokomplex wurde an die Zelloberfläche transportiert und war funktionell aktiv (62, 63, 70, 98, 109).

1.3.3. Regulationskaskade der Genexpression, DNA-Replikation, post translationale Modifikation von Glykoproteinen

Nach der Penetration erreicht das Nukleocapsid die Kernporen und setzt die Virus-DNA in das Nukleoplasma frei. Einige Tegumentproteine wie z.B. VP16(α TIF) gelangen ebenfalls in das Nukleoplasma (7). VP16 induziert unmittelbar nach Eintritt des viralen Genoms in den Kern die Transkription der ersten viralen Genprodukte, der sog. Immediately-Early (IE)- oder α -Proteine (54, 86, 99, 101, 108). Die fünf Proteine ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 und ICP47 (ICP: Infected Cell Polypeptide) dienen als Transaktivatoren für die Synthese der Early (E)-oder β -Proteine, die 5-7h nach Infektionsbeginn ihr Expressionsmaximum erreichen. Zu den β -Polypeptiden gehören Enzyme, die zur viralen DNA-

Replikation nötig sind: die virale DNA-Polymerase, eine Thymidinkinase, eine Ribonukleotidreduktase und eine alkalische Exonuklease.

Die Late (L)- oder γ -Proteine erreichen ihr Expressionsmaximum 12-18h nach der Infektion. Es handelt sich vorwiegend um Strukturelemente des Virus, Komponenten des Nukleocapsids, des Teguments und die Glykoproteine der Membranhülle. Ihre Expression ist bis auf die Untergruppe der γ_1 ($\beta\gamma$)-Polypeptide stark abhängig von der DNA-Replikation und Transkription der β -Gene. Die γ_1 -Proteine werden bereits nach Vorliegen funktioneller α -Proteine gebildet. Hierzu gehören ebenfalls Strukturproteine des Virus (gB, gL, α TIF) (68, 125).

Die virale DNA-Replikation erfolgt am zuvor zirkularisierten Genom (8). Sie beginnt an drei definierten Startpunkten: oriS1, oriS2 und oriL. Durch einen "rolling circle"-artigen Mechanismus entstehen lange konkatemere DNA-Moleküle, deren Länge die des viralen Genoms weit überschreitet (73). Sie werden anschließend an spezifischen Erkennungssequenzen auf Genomlänge zugeschnitten und nach Regenerierung der zur Zirkulation deletierten terminalen a-Sequenz in zuvor im Kern formierte leere Kapside verpackt (108).

1.4. Biochemie, Transport und Funktion der Glykoproteine H und L

Glykoprotein L ist ein Protein von 224 Aminosäuren, dessen reife Form ein experimentell ermitteltes Molekulargewicht von 30-40 kDa besitzt. HSV-1 gL ist über Komplexbildung mit gH zellmembranassoziiert (2, 38, 70). Es enthält eine aminoterminalen Signalsequenz, eine N-verbundene Glycosylierungsstelle und drei O-verbundene Glycosylierungsstellen (98). 4 Cysteinreste formen intramolekulare Disulfidbrücken (18, 70). Alle diese Cysteinreste sind von Bedeutung für die gL-Funktion in der Fusion. Die Region zwischen den Aminosäuren 155 und 161 ist notwendig für die gL-Funktion (109, 122).

In Abwesenheit von gH wird gL von einem 25-30 kDa-Precursor-Protein zum reifen 30-40 kDa-Protein prozessiert und ins Zellmedium sezerniert (38). Der gH/gL-Komplex wird als funktionelle Einheit für Penetration und Synzytium-Bildung angesehen (38, 70, 84, 109, 122, 127, 128, 132).

Antikörper gegen gL sind in der Lage die Zellfusion zu unterbrechen, nicht jedoch die virale Infektiosität (95). Die antigenen Determinanten wurden in der C-terminalen Region von HSV-1 gL lokalisiert.

Glykoprotein H ist ein integrales Membranprotein aus 838 Aminosäuren. Die reife Form von gH hat ein experimentell ermitteltes Molekulargewicht von 110 kDa und ist auf der Zelloberfläche infizierter Zellen nachweisbar (3, 17, 34, 43, 61, 62, 128)

In Abwesenheit von gL exprimiertes gH wird im ER zurückgehalten und kann nicht an der Zelloberfläche oder im Virion detektiert werden (15, 43, 61, 62, 63, 70).

gH enthält u.a. eine hydrophobe α -Helix 1 (Aminosäuren 377-397) und 2 „heptad repeat“ (HR) genannte Regionen (57, 58, 59). Die α -Helix 1 ist in der antigenen „Loop“ zwischen den Cysteinresten 2 und 4 lokalisiert. Diese Sequenz ist zur Interaktion mit biologischen Membranen fähig. Durch die Interaktion mit gD wird sie in eine membrangebundene Peptidstruktur umgewandelt. Diese Eigenschaften machen sie zu einem Fusionspeptid.

Die HR 1 und HR 2 Sequenzen befinden sich abwärts von dem Fusionpeptid und oberhalb der transmembranen Sequenz (58, 59). Dazwischen sind die Aminosäuren der α -Helix 2 lokalisiert. HR 1 und HR 2 formen zusammen einen stabilen Komplex und fördern die Bildung einer helikalen Spirale. Die α -Helix 2 zeigt eine schwächere Interaktion mit Membranen als die α -Helix 1. Mutationsanalysen zeigten, dass es sich hierbei um keine essentielle Domäne handelt (55).

Die Heterodimerbildung aus gH und gL ist von Bedeutung für die Bindung der gH-spezifischen monoklonalen Antikörper 53S und LP11. Diese binden an gH nur in der Präsenz von gL (61,62).

1.5. Green Fluorescent Protein

Das grün fluoreszierende Protein (GFP) ist ein autofluoreszierendes Protein. Es strahlt grünes Licht ab, wenn es durch blaues Licht angeregt wird. Die zwei am

besten charakterisierten Wildtyp-GFPs stammen von *Aequorea victoria*, einer Tiefseequalle und *Renilla reniformis* (20, 21, 96).

Aequorea-GFP ist ein Protein von 238 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 26,9 kDa. Sein größter Absorptionsgipfel liegt bei 395 nm und sein Emissionsmaximum bei 508 nm. Es bedarf des gesamten Proteins, um eine funktionierende Fluoreszenz zu erhalten, die sich erst 1-3 Stunden nach der Proteinsynthese entwickelt (24).

In das Wild-Typ-GFP wurden mehrfach Mutationen eingeführt, so dass man GFPs mit verbesserten Eigenschaften und verschiedene Farbspektren erhalten hat. Hier seien einige GFP's aufgeführt (26, 65):

	Anregungsmax.(nm)	Emissionsmax.(nm)	Farbe
GFP	395 (475)	508	grün
EGFP	488	507	grün
EYFP	513	527	gelb-grün
EBFP	380	440	blau
ECFP	433(453)	475 (501)	cyan

GFP ist nicht cytotoxisch, beeinflusst die Wirtszellen kaum und funktioniert in vielen Spezies. Es kann unter dem Fluoreszenzmikroskop durch einfaches Betrachten leicht nachgewiesen werden. Natürlich kann das Protein auch immunologisch im Western-Blot mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Die Herstellung von Fusionsproteinen, die N- oder C-terminal eine GFP-Sequenz als Marker tragen, ermöglicht die subzelluläre Lokalisation. So können Genexpression und Genregulation in Zellen untersucht werden. Analog ist es möglich, virale Proteine mit GFP zu markieren und deren Verteilung in infizierten Zellen zu beobachten. So sind schon z.B. einige Glykoproteine des HSV-1 mit Hilfe von EGFP hinsichtlich ihrer Funktion im Infektionszyklus näher charakterisiert worden (21, 27, 41, 45, 46, 87, 121, 136).

1.6. Fragestellung

Die Glykoproteine L und H bilden einen Heterokomplex, der für die korrekte Faltung und den intrazellulären Transport beider Proteine notwendig ist. Der Komplex spielt eine essentielle Rolle beim Viruseintritt in die Zielzelle und bei der Virusausbreitung über Zell-zu-Zell-Kontakte.

Die Herstellung eines Fusionsproteins aus gL und EGFP bzw. EYFP bot die Möglichkeit, das Expressionsmuster in animalen Zellen sowie sein Verhalten bei der Virusreplikation zu untersuchen.

Hier stellten sich folgende methodische Fragen:

- 1.) Lässt sich ein funktionsfähiges Fusionsprotein aus gL und EGFP herstellen?
- 2.) Lässt sich das Fusionsprotein in Säugerzellen exprimieren?
- 3.) Kann gLEGFP die Funktion von Wildtyp-gL übernehmen?

Zur Klärung der oben gestellten Fragen sollte gL in den pEGFP-1-Vektor, in welches zuvor der gD-Promotor des HSV-1 eingebaut wurde, kloniert werden. Ziel war es, auf diese Weise eine regulierbare Expression zu erreichen.

Die Konstrukte sollten zuerst transient exprimiert werden. Im Falle des Erfolgs sollte dann die Herstellung von stabilen Zelllinien erfolgen, mit deren Hilfe das Fusionsprotein bezüglich seines Expressionsmusters, der Komplexbildung mit gH sowie seines Verhaltens bei der Virusreplikation charakterisiert werden sollte.

2. Materialien

2.1. Viren

HSV-1 Stamm 17 wurde mir freundlicherweise vom Institut für Medizinische Mikrobiologie- Klinische Virologie in Münster zur Verfügung gestellt.

Die gH-negative Virusmutante stammt von P.G. Spear, Chicago, USA.

2.2. Zelllinien

- Vero-Zellen (African green monkey kidney cells, Nierenzellen der afrikanischen grünen Meerkatze) Vircell S.L., Granada, Spanien
- HeLa -Zellen (menschliche Zervix-Karzinom-Zellen)
V.I.V.A. Köln

VerogLEGFP 4.9C, 4.10A und VerogLEYFP 4.4F2: im Rahmen dieser Arbeit etablierte Vero-Zelllinien mit konstanter gLEGFP-Expression (4.9C) bzw. induzierbarer gLEGFP-/gLEYFP-Expression (4.10A und 4.4F2).

2.3. Medium und Medienzusätze für die Zellkulturen

Minimal Essential Medium (MEM)	Biochrom KG, Berlin
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom KG, Berlin
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS def.) (ohne Calcium- und Magnesiumsalze)	Biochrom KG, Berlin
Phosphat-gepufferte Salzlösung (Dulbecco's PBS)	Biochrom KG, Berlin
Trypsin-EDTA-Lösung	Biochrom KG, Berlin
Gentamycin	GibcoBRL, Eggenstein
L-Glutamin	Biochrom KG, Berlin
Penicillin/Streptomycin (10000U/ml Penicillin, 10000µg/ml Streptomycin)	GibcoBRL, Eggenstein
Geneticinsulfat (G418)	GibcoBRL, Eggenstein

2.4. Antikörper

Das HSV-1 gL-spezifische polyklonale Kaninchenserum E24/7 wurde mir freundlicherweise von Prof. Dr. Roberto Manservigi, Institut für Mikrobiologie, Ferrara, zur Verfügung gestellt. Es ist gegen das synthetische Oligopeptid UL1-2 (CATKSRRRRPHSRRL) gerichtet und wurde entsprechend der Beschreibung bei Hutchinson et al., 1992 hergestellt.

HSV-1-spezifisches Kaninchenserum	Dako Immunochemicals, Kopenhagen
-----------------------------------	-------------------------------------

Biotin-SP-conjugate d F (ab)2 goat-anti mouse IgG (H+L)	
Peroxidase-conjugated F (ab)2 goat-anti rabbit IgG (H+L)	
Peroxidase-conjugated F (ab)2 goat-anti mouse IgG (H+L)	Calbiochem, Frankfurt

2.5. Bakterienstämme

Transformationskompetente Bakterien:

E.coli JM 109	Promega, Mannheim
E.coli DM1	GibcoBRL, Eggenstein

2.6. Medien für die Bakterienkultur

LB-Agar	GibcoBRL, Eggenstein
LB-Broth-Base (Fertigmedium)	GibcoBRL, Eggenstein
(ggf.Zusatz von 1µl Ampicillin-Lösung (100mg/ml LB Agar) oder Kanamycin Lösung (50mg/ml LB-Agar))	
S.O.C. Medium	GibcoBRL, Eggenstein

2.7. Nukleinsäuren

Das Konstrukt pEUKC1T7gL wurde mir freundlicherweise von meinem Betreuer Prof. Dr. J. E. Kühn überlassen.

Der Ausgangsvektor pEUK-C1 (Eukaryontischer Expressionsvektor) von der Firma Clontech aus Heidelberg besitzt das Ampicillin-Resistenzgen, den späten SV40-Promotor und die späte SV-40-Region für den Replikationsstart (SV-40 origin of replication).

Der modifizierte pEUK-C1-Vektor ist um die Sequenz des T7-Promotors (TAAT ACGA CTCA CTAT AGGG AGA) (33) und des Glycoproteins L des HSV-1 erweitert. Er wurde von Thilo Oelert im Rahmen seiner Promotionsarbeit am Institut für Virologie der Universität zu Köln erzeugt.

pGEM-T Vector Systems

Promega, Mannheim

Der Vektor ermöglicht eine vereinfachte Klonierung von PCR-Produkten, die mittels Taq-Polymerase amplifiziert wurden. Der Ansatz beruht auf der Tatsache, dass die Taq-Polymerase keine Fragmente mit glatten Enden produziert, sondern meist mit einem unspezifischen Überhang mit einer Base, bei der es sich öfters um Adenosin handelt. Der pGEM-T -Vektor enthält 3-terminale Thyminid-Überhänge. Dadurch lassen sich PCR-Fragmente leichter einklonieren. Desweiteren sind im Vektor das Ampicillin-Resistenzgen, innerhalb der MCS der T7- und SP6-Promotor sowie das lacZ-Gen enthalten, welches für das α -Peptid des Enzyms β -Galaktosidase kodiert. Dadurch wird eine sog. blue/white Selektion der korrekten Klone auf Ampicillin/IPTG/X-Gal-Agarplatten ermöglicht. Eine erfolgreiche Klonierung des PCR-Produkts bewirkt meist eine Unterbrechung der enzymkodierenden Sequenz, Insert-haltige Klone erscheinen dann als weiße Kolonien. Blaue Kolonien resultieren, wenn die Klone kein Insert enthalten oder seltener, wenn das Fragment in frame mit dem lacZ-Gen ligiert wird.

pEGFP-1 und pEYFP-1 (Eukaryontische Expressionsvektoren, Shuttlevektoren)

Clontech, Heidelberg

Die Vektoren pEGFP-1 und pEYFP-1 sind stabil integrierbar in das Genom eukaryontischer Zellen und vermitteln Geneticin-Resistenz durch das Gen für Neomycin-Phosphotransferase. Das in dem Vektor pEGFP-1 enthaltene promotorlose EGFP (enhanced green fluorescent protein)-Gen kodiert für ein grün autofluoreszierendes Protein mit einem Anregungsmaximum bei 488nm. Die Sequenz EYFP (enhanced yellow fluorescent protein) kodiert für ein gelb-grün autofluoreszierendes Protein mit einem Anregungsmaximum bei 513 nm. Zur Klonierung von Fremdsequenzen vor EGFP bzw. EYFP steht eine Multiple Cloning Site zur Verfügung. Außerdem beinhalten die Vektoren den späten SV40-Promotor, die späte SV40-Polyadenylierungsregion, die SV40-Region für den Replikationsstart (SV40 origin of replication) und das Kanamycin-Resistenzgen.

Der modifizierte Vektor pEGFPgDProT7 wurde mir von A. Heid aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie- Klinische Virologie überlassen. Dieser ist um den gD-Promotor von HSV-1 und den T7-Promotor erweitert.

2.8. Nukleotide, Oligonukleotide und Primer

dATP, dCTP, dGTP, dTTP Pharmacia Biotech, Freiburg

PCR-Primer, hergestellt von der Firma Carl Roth, Karlsruhe:

gL EGFP Eco RI-fw-Primer:

5'-GCG CGA ATT CGC CAC CAT GGG GAT TTT GGG TTG GGT C-3'

gL EGFP Bam HI-bw-Primer:

5'-CCG GTG GAT CCA GGC GCC` GGG AGT GGG GTC GT-3

2.9. Molekulargewichtstandards

100 bp-Leiter	Pharmacia Biotech, Freiburg
200bp-Leiter	Pharmacia Biotech, Freiburg
1 kb-Leiter	Pharmacia Biotech, Freiburg
KiloBase™ DNA Marker	Pharmacia Biotech, Freiburg
Prestained SDS-Page Standards	Bio-Rad, München

2.10. Enzyme

Restriktionsenzyme:

Die für diese Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen und die entsprechenden Puffer wurden von den Firmen Roche (vormals Boehringer Mannheim) (Mannheim) und New England Biolabs (Schwalbach) bezogen.

Alkalische Phosphatase (CIAP)	GibcoBRL, Eggenstein
Streptavidin-Peroxidase	Calbiochem, Bad Soden
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Schwalbach
T7-RNA-Polymerase (Bestandteil des in vitro Transkription/ Translations-Kits)	Promega, Mannheim
Taq-DNA-Polymerase	Pharmacia Biotech, Freiburg
RNAse (Bestandteil des Plasmid-Kits)	Qiagen, Hilden
Endoglycosidase H	Roche (Mannheim)
N-glycosidase F, rekombinant	Roche (Mannheim)

2.11. Reagenziensysteme

TNT T7 Coupled Reticulocyte Lysate System	Promega, Mannheim
Canine Pancreatic Microsomal Membranes	Promega, Mannheim
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
FuGENE™6 Transfection Reagent	Roche, Mannheim
NuPAGE Western blotting Analysesystem	Novex, San Diego, USA

2.12. Chemikalien/Reagenzien

Ampicillin	Sigma, München
Ampuwa, steriles Wasser	Braun, Melsungen
Aqua ad injectabilia	Fresenius, Bad Homburg
BSA (Rinderserumalbumin)	New England Biolabs, Schwalbach
Carboxymethylcellulose	Merck, Darmstadt
4-Chloro-1-Naphthol Tabletten, 30mg/Tablette	Sigma, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma, München
Glycerol	Merck, Darmstadt
Histofluid	Engelbrecht, Edermünde
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma, München
Methanol	Riedel-deHaën, Seelze
N,N Dimethylformamid	Sigma, München
NuSieve 3:1 Agarose	Biozym, Oldendorf

Seakem GTG Agarose	Biozym, Oldendorf
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Wasserstoffperoxid 30%	Merck, Darmstadt

Alle weiteren, hier nicht gesondert aufgeführten Laborchemikalien wurden von den Firmen Gibco BRL (Eggenstein), Sigma (München) und Merck (Darmstadt) bezogen.

2.13. Puffer

Pufferlösungen für die Molekularbiologie wurden entsprechend den Protokollen von Sambrook et al., 1989 angesetzt

2.14. Laborbedarf

Cryo Vials (Einfrierröhrchen)	Greiner, Solingen
GEL-Blotting-Papier GB 002	Schleicher & Schuell, Dassel
Immobilon-P Transfer Membranes	Millipore, Bedford
Mehrfachkulturplatten	Greiner, Solingen
Mikroliterpipetten	Eppendorf, Hamburg
Objektträger	Engelbrecht, Edermünde
PCR-Röhrchen	Greiner, Solingen
Petrischalen	Greiner, Solingen
Probenröhrchen 15 bzw. 50 ml	Greiner, Solingen
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg & Greiner, Solingen
Polysterolreaktionsgefäße	Greiner, Solingen
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Zellkulturflaschen	Greiner, Solingen
Ultra-Clear Gentrifuge Tubes (Zentrifugationsröhrchen)	Beckman Instruments, München

Filmmaterial

Elite Chrome 400

Kodak AG, Stuttgart

TURA 200 DX Chrome

Tura AG, Düren

GeräteCO₂-Begasungsbrutschrank

Heraeus, Düsseldorf

Hera Safe 15 (Sicherheitswerkbank)

Heraeus, Düsseldorf

Thermocycler GeneAmp® PCR System 9700

Perkin-Elmer, Überlingen

Pro II Ne-1540 (Mikrowellenofen)

Panasonic, Japan

Unitek HB-130 (Heizblock)

Salmon Electronics Ltd,
England

pH 535 Multi Cal (pH-Meter)

WTW, Weilheim

Labor-Autoklav La-MCS 203

Asolf Wolf SANOclav,
Geislingen

Pipetus-Akku (Pipettierhilfe)

Hirschmann Laborgeräte,
Eberstadt

Vortex Reax Top

Heidolph, Nürtingen

UV-Tisch, Photodokumentationskamera

Biometra, Göttingen

Elektrophoresenetzgeräte:

Phero-Stab 0312

Biotec-Fischer, Reiskir-
chen

PharmaciaLKB-EPS 500/400

Pharmacia-LKB, Freiburg

Gelkammern:

Agarose-Horizontalgelkammer

Biotec-Fischer, Reiskir-
chenVertikal-Gelelektrophoresekammer XCell II
(Polyacrylamidgele)

Novex, San Diego, USA

Mikroskope:

Axiovert 25

Zeiss, Jena

Axioplan 2

Zeiss, Jena

Zentrifugen:

Biofuge fresco

Heraeus, Düsseldorf

Biofuge 28 RS

Heraeus, Düsseldorf

Varifuge 3.0 R

Heraeus, Düsseldorf

Optima L-70K Ultracentrifuge

Beckman Instruments,
München

Waagen:

Kern 440-45

Gottl. Kern & Sohn, Albstadt

Sauter SM 1000

Sauter, Essen

Wasserbäder:

Wasserbad 7

Memmert, Schwalbach

Schüttelwasserbad 1086

GFL, Burgwedel

PharmaciaLKB-MultiTemp II

Pharmacia-LKB, Freiburg

3. Methoden

3.1. Molekularbiologische Methoden

3.1.1. Molekularbiologische Standardmethoden

Konzentrationsbestimmung von DNA, Spaltung mit Restriktionsendonukleasen und Ligation von DNA-Fragmenten wurde nach Protokollen von J. Sambrook, E. F. Fritsch und T. Maniatis, 1989 durchgeführt.

3.1.2. Isolation von Plasmid-DNA

Transformierte *E.coli*-Klone wurden über Nacht in 5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin bei 37°C im Inkubator geschüttelt. Hiervon wurde 1 ml entnommen und nach Zusatz von 500µl Glycerin bei - 80°C eingefroren, der Rest bei 6000 x g abzentrifugiert. Die Isolation bakterieller Plasmid-DNA aus den Bakterienpellets erfolgte entsprechend einer modifizierten alkalischen Extraktionsmethode nach Birnboim & Doily und der Adsorption von DNA an Kieselerde unter Verwendung des Qiagen Plasmid Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Die DNA wurde in 30 µl TE-Puffer von der Säule eluiert. Für größere DNA-Präparationen wurden die entsprechenden Plasmid Midi Kits von Qiagen verwendet.

3.1.3. DNA-Agarosegelelektrophorese und Fragmentelution

Zur Trennung der zu isolierenden DNA-Fragmente wurden horizontale Agarosegele mit 0,8-1% Seakem Agarose (Biozym, Hess. Oldendorf) in TAE-Puffer verwendet.

Nach Anfärben im Ethidiumbromidbad (1 µg/ml) wurden die Fragmente unter UV-Licht (Wellenlänge 366 nm) sichtbar gemacht. Die zu isolierenden Fragmente wurden mit einem Einmalskalpell aus dem Gel herausgeschnitten und mittels Qiaquick Gel Extraktion Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers eluiert.

3.1.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Aufreinigung von PCR-Produkten

Definierte DNA-Bereiche wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion vervielfältigt. Länge und GC-Anteil der Primer wurden im Hinblick auf eine optimale Anlagerungstemperatur bestimmt. Die Primer enthielten Schnittstellen für bestimmte Restriktionsenzyme, die später das Einklonieren des PCR-Produkts in den Zielvektor ermöglichten, des Weiteren Consensus Sequenz (GCCA/GCCATGG) für einen effektiven Transkriptionsstart durch die eukaryontischen Ribosomen. Ein Reaktionsansatz enthielt Reaktionspuffer (10-fache Stammlösung), beide Primer (10 µM Stammlösung, Endkonzentration je 0,5 µM), Oligonukleotid-Mix ("dNTPs"/10 mM Stammlösung, Endkonzentration 0,2 µM) und Taq-DNA Polymerase (1 U) in 100 µl Endvolumen. Die Reaktionsansätze wurden in PCR-Reaktionsgefäßen im Thermocycler (Gene Amp® PCR System 9700, Perkin Elmer, Überlingen) inkubiert. 10 Amplifikationszyklen setzen sich standardmäßig aus folgenden Schritten zusammen: 10 min Denaturierung bei 95 °C im ersten Zyklus, 30 s Denaturierung in folgenden 10 Zyklen, 30 s Primeranlagerung bei 60 °C und 45 s DNA-Synthese bei 72 °C (im letzten Zyklus 10 min). Nach Überprüfung der Größe des PCR-Produkts im Vergleich zum Molekulargewichtsmarker im 0,8 %-igen Agarosegel wurde das PCR-Produkt unter Verwendung des Qiaquick Purifikation Kits (Qiagen, Hilden) direkt aus dem Amplifikationsansatz gereinigt und in 30 µl TE eluiert.

3.2. Transformation kompetenter Bakterien

Für die Transformation wurden transformationskompetente *E.coli* JM 109 (Promega, Mannheim) und DM1 (Gibco BRL, Eggenstein) verwendet. Für Transformationsexperimente wurden sie langsam auf Eis aufgetaut. 1 bis 3 µl (1-10 ng DNA) des eisgekühlten Ligationsansatzes wurden 50 µl transformationskompetenten Zellen auf Eis zur Adsorption für 30 min zugegeben. Ein anschließender Hitzeschock bei 42 °C für 2 min diente der Einschleusung der Plasmide in die Bakterien. Danach wurde der Ansatz 3 min auf Eis gekühlt. Während der darauf folgenden Inkubation in 900 µl SOC-Medium für 1 h bei 37 °C wurde die Ex-

pression des über das Plasmid aufgenommenen Antibiotika Resistenzgens induziert.

Zur Selektion transformierter Bakterien wurden antibiotikahaltige LB-Agar-Platten mit 100-300 µl Aliquots der Bakteriensuspension beimpft und über Nacht im Brutschrank inkubiert.

3.3. Zellkulturtechniken

3.3.1. Zellkultur

Vero- und HeLa-Zellen wurden in Gewebekulturflaschen unter Standardbedingungen bei 37 °C im CO₂-Begasungsbrutschrank (Heraeus, Düsseldorf) kultiviert. Das verwendete Zellkulturmedium MEM (Minimum Essential Medium) enthielt 10 % FCS (fetales Kälberserum), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Die Passagierung der Stammhaltung erfolgte zweimal pro Woche. Dazu wurde der Zellrasen mit PBS def. gewaschen, die Zellen mit 0,05 % Trypsin in PBS 0,02 % EDTA abgelöst, die Suspension im Verhältnis 1:3 umgesetzt und in frisches Kulturmedium aufgenommen. Das Einfriermedium setzte sich aus 70 % Vollmedium, 20 % FCS und 10 % DMSO zusammen.

3.3.2. Transfektion von Zellen

Die Transfektion von Plasmid-DNA in Säugerzellen wurde mittels FuGENE 6 Transfection Reagent durchgeführt. Das Einschleusen von DNA beruht bei diesem Verfahren auf der Lipofektion. Die DNA bildet mit den in dem Reagenz enthaltenen Lipiden (non-liposomal formulation) einen Komplex, der mit der Zellmembran reagiert (B. Wiesenhofer et al., Journal of Neuroscience Methods 1992 (1999), S. 145-152).

Dazu wurden die Zellen in Gefäßen mit 35 mm Durchmesser ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 50-80 % inkubiert. Nach Empfehlung des Herstellers wurden 3 µl FuGENE 6 Reagenz direkt zu 97 µl serumfreien Zellkulturmedium zuge tropft. Diese Lösung wurde dann zu 1-2 µg Plasmid-DNA zugegeben und 15 min bei RT inkubiert. Danach wurde die Transfektionslösung langsam auf

die Zellen getropft und das Kulturgefäß leicht geschwenkt. Nach ca. 6-stündiger Inkubation bei 37 °C wurde das Medium gegen frisches gewechselt und die Zellen 12 bis 24 h bebrütet.

3.3.3. Selektion von positiven Zellen nach der Transfektion

Die Selektion positiver Zellen erfolgt über die vektorvermittelte Geneticin (G418)-Resistenz.

Die zuvor mit 1 µg linearisierte Plasmid-DNA transfizierten Zellen (1-3 x 100000 Zellen) wurden mit 0,3 ml Trypsin/EDTA abgelöst, gut resuspendiert und mit Geneticin-haltigem Vollmedium (400 µg/ml) auf 10 ml gebracht. Die Zellsuspension wurde in Zweier- bzw. in Dreierschritten weiter verdünnt bis eine Endkonzentration von ca. 100 Zellen pro 100 µl erreicht wurde. Die einzelnen Verdünnungsstufen wurden in 100 µl Medium/Loch in 96-Loch-Platten ausgesät und bis zur Koloniebildung bei 37 °C inkubiert. Nach Bedarf wurde das Medium ergänzt. Je nach Anzahl der überlebenden Kolonien wurden sie nochmals in 96-Loch-Platten ausgesät oder gleich in 24-Loch-Platten umgesetzt. Klone mit günstigem Wachstumsverhalten wurden dann zur Weiterkultur in 6-Loch-Platten ausgewählt und später in kleine und mittlere Zellkulturflaschen umgesetzt.

3.4. Arbeiten mit Viren

3.4.1. Herstellung eines Standardviruspools

Die Standardviruspools wurden durch mindestens zweimaliges Passagieren mit einer MOI von 0,01 PFU/Zelle hergestellt.

Dadurch sollte die Entstehung von defekten interferierenden Partikeln auf möglichst niedrigem Niveau gehalten werden (*v.Magnus, 1954; Bronson et al., 1973; Schröder et al, 1979*).

3.4.2. Plaqueassay zur Bestimmung der Infektiosität von HSV-1

Die Anzahl infektiöser Partikel in Kulturüberständen virusinfizierter Vero-Zellkulturen wurde mittels Plaqueassay bestimmt. Hierzu wurde eine Verdün-

nungsreihe der Virusstammlösung mit dem Faktor 10 angelegt und diese für 1 h bei 37 °C mit Vero-Zellen inkubiert. Danach wurde der Zellrasen zur Entfernung nicht adsorbierter Viruspartikel mehrmals gewaschen und mit 0,5 % Carboxymethylzellulose (CMC)-haltigem Kulturmedium überschichtet.

3 Tage später wiesen die Zellen durch den zytopathischen Effekt der Infektion Plaques auf. Sie wurden optisch ausgezählt und der Virustiter unter der Berücksichtigung des entsprechenden Verdünnungsfaktors in pfu. (plaque forming unit)/ml bestimmt.

3.4.3. Aufkonzentrierung der Viruspartikel

Hierzu wurde ein Zellkulturüberstand von HSV-infizierten Vero-zellen verwendet. Dieser wurde zunächst durch Zentrifugation bei 10 000 x g und 4 °C für 10 min von Zellresten befreit und in Ultrazentrifugationsröhrchen pipettiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 24 000 U/min für 1 h bei 4 °C in einem Beckman SW28 Rotor. Der Überstand wurde verworfen, die Pellets erst getrocknet, dann in 500µl Hanks-Lösung resuspendiert und schließlich zusammengeführt. Es wurden 2,5ml 20 %iger Saccharose-Lösung vorgelegt und diese vorsichtig mit der resuspendierten Viruslösung überschichtet. Die darauf folgende Zentrifugation erfolgte bei 35 000U/min für 1 h bei 4 °C (Optima L-70K Ultracentrifuge, Beckman Instruments, München). Das Viruspellet wurde in 250µl PBS vorsichtig resuspendiert und bei – 80 °C aufbewahrt.

3.5. Techniken zur Proteindetektion

3.5.1. Lyse der Zellen

Die in 6-Loch-Platten ausgesäten und ggf. mit HSV-1 infizierten Zellen wurden 2 x mit 1 ml PBS def. gewaschen, mit einem Zellschaber vom Untergrund gelöst und in 1 ml PBS in 2 Eppendorf-Reaktions-gefäße überführt. Die Kulturgefäße wurden nochmals mit 500 µl PBS def. nachgespült und 4 Minuten bei 13 000 rpm zentrifugiert. Die Pellets wurden in 50 µl 2-fach reduzierendem SDS-Probenpuffer aufgenommen, bei 70 °C inkubiert und anschließend mittels SDS-

PAGE aufgetrennt. Pellets, die für einen Glucosidaseverdau bestimmt waren, wurden in 80 µl PBS def. vorsichtig aufgenommen und mit 8 µl Verdaupuffer sowie 3 µl Protease-Inhibitor versetzt. Danach erfolgten eine 25-minütige Inkubation bei 70 °C, Abzentrifugieren und Abkühlen der Proben sowie eine 2-stündige Inkubation bei 37 °C mit 1 µl Endoglucosidase F (Roche) (200 mU in 50 mM Natriumacetatpuffer, pH 5,5) oder H (1 mU in 100 mM Natriumacetat-Puffer, pH 5).

Das weitere Vorgehen erfolgte wie bei unbehandelten Proben.

3.5.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Trennung von Proteinen aufgrund ihres Molekulargewichtes. Das Trenngel, bestehend aus 10 % Acrylamid/Bis-Acrylamid und der Elektrophoresepuffer sowie die Apparatur, wurden von der Firma Novex (San Diego, USA) bezogen. Die Handhabung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen mit entsprechenden Mengen 4 x NuPAGE Sample Buffer, NuPAGE Reducing Agent und aqua bidest versetzt und in 10 µl Volumen auf das Gel aufgetragen. Ein Molekulargewichtsmarker wurde ebenfalls aufgetragen. Anschließend wurde die Apparatur mit Elektrophoresepuffer befüllt.

Die Elektrophorese wurde bei 200 V und 150 mA durchgeführt und dauerte 35 min.

3.5.3. Western-Blot und Immunopräzipitation

Der Western-Blot dient dem Nachweis von Proteinen durch spezifische Antikörper.

Die in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden, um sie für die Reaktion mit Antikörpern zugänglich zu machen, elektrophoretisch auf eine Immobilon-Filtermembran übertragen. Hierzu wurden ein Schwamm, Filterpapiere und die zuvor mit Methanol benetzte und anschließend mit aqua bidest gewaschene Blotmembran in eine Schale mit Blotpuffer gelegt.

Das Polyacrylamidgel wurde der Membran blasenfrei aufgelegt, ebenfalls mit Filterpapieren und einem Schwamm bedeckt, in die Blotapparatur eingesetzt und 60 min bei 150 mA und 18 V geblottet. Nach Abschluss des Proteintransfers wurde die Membran vom Gel genommen und zur Renaturierung der geblotteten Proteine und zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindung 30 min bei RT auf dem Schüttler in Blocklösung (3 % BSA in PBS def. bzw. Milchpulver in PBS def.) inkubiert. Für alle weiteren Anwendungen wurde die Blocklösung 1:4 verdünnt. Nach dem Blocken wurde die Membran über Nacht bei RT mit dem Erstantikörper in Blocklösung inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen von je 5 min mit Blocklösung entfernt. Der Antigen-Antikörper-Komplex wurde durch einen Biotin-gekoppelten Zweitantikörper detektiert (Biotin-gekoppelte F(ab')₂ Goat Anti-Mouse IgG, Calbiochem, Bad Soden).

Hierzu wurde die Membran mit dem Zweitantikörper in Blocklösung 90 min bei RT inkubiert und anschließend mit Blocklösung gewaschen. Es folgte die Inkubation mit 1:1000 in Blocklösung verdünnter Streptavidin-Peroxidase für 1 h. Anschließend wurde 2 x mit Blocklösung, 1 x mit PBS def. gewaschen. Zur Sichtbarmachung der Proteinbanden wurde der Blot mit Substratlösung (0,08 % Wasserstoffperoxid mit einer Tablette 4-Chloronaphthol in 10 ml Methanol) entwickelt. Zugabe von aqua bidest stoppte die Farbreaktion.

Bei der Ko-Immunopräzipitation wurden dem Zellysat spezifische Antikörper zugegeben, um das Protein gezielt zu binden. Über diesen Antikörper wurde dann das gesuchte Protein aus dem Lysat herausgezogen. Hierzu wurden Protein G-Beads verwendet. Dabei handelte es sich um Protein G-beschichtete Kügelchen. Protein G, ein Bestandteil der bakteriellen Zellwand bindete an die Fc-Region der zuvor verwendeten spezifischen Antikörper. Die Isolierung der Komplexe erfolgte über Zentrifugation und mehrere Waschschriffe. Anschließend erfolgte der Nachweis über einen Western-Blot.

3.6. In vitro Transkription/Translation

In vitro Transkription- und Translationsexperimente wurden unter Verwendung des kombinierten Retikulozytenlysats TNT T7 (Promega, Madison) nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Das Konstrukt pEUKT7C1gL enthielt bereits die kodierende Sequenz von Glykoprotein L. Pro Ansatz wurde 1 µg zirkuläres Plasmid-DNA eingesetzt, das mit 1:10 verdünntem RNase-freiem TE-Puffer von einer Qiaprep 8 Plasmid Kit-Säule eluiert worden war. Der Ansatz enthielt weiterhin 40 µl konzentriertes Retikulozytenlysats, 1 x Reaktionspuffer, alle Aminosäuren (20 µM) außer Methionin, 1 µl L-Methionin (1 µM), 1 µl T7-RNA-Polymerase (Konzentration vom Hersteller nicht angegeben), 20U RNase-Inhibitor sowie RNase-freies Wasser zur Ergänzung des Endvolumens auf 50 µl. Er wurde auf Eis unter Beachtung aller Vorsichtsmaßnahmen zur Minimierung des Risikos einer Kontamination mit RNAsen zusammenpipettiert. Die Reaktion erfolgte während 90-minütiger Inkubation bei 30 °C. 0,5-10 µl des Ansatzes wurden nach 1:1-Verdünnung mit SDS-PAGE-Probenpuffer und 5-minütigem Kochen zur Auftrennung der Translationsprodukte auf ein 10 % SDS-PAGE (3.4.2.) geladen. Die aufgetrennten Proteine wurden im Western-Blot detektiert.

4. Ergebnisse

4.1. Klonierung von pEGFPgDProT7gL

4.1.1. In vitro-Transkription/-Translation von gL aus dem Ausgangsvektor pEUKC1T7gL

Zunächst wurde in Vorversuchen die Intaktheit der gL-Sequenz aus dem Ausgangskonstrukt pEUKC1T7gL überprüft. Dazu wurde das Konstrukt in vitro transkribiert und translatiert (3.5.). Das Glykoprotein L wurde mittels SDS-PAGE (3.4.2.) aufgetrennt und im Western-Blot (3.4.3.) mit einem gL-spezifischen polyklonalen Kaninchenserum (Serum E24/7) detektiert (vgl. Abb. 1). Als Negativkontrolle wurde biotinyliertes gH aufgetragen, welches erwartungsgemäß mit gL-spezifischem Antiserum nicht nachgewiesen werden konnte.

Die Detektion über den Einbau von biotinyliertem Lysin während der in vitro-Transkription/-Translation mit Streptavidin-AP gelang ebenfalls.

Für das Konstrukt konnte die Existenz eines intakten Leserahmens nachgewiesen werden. Das Molekulargewicht des detektierten gL (34kDa) stand im Einklang mit dem in früheren Experimenten ermittelten MG von 30-40 kDa.

Spur	Spurbelegung	Auftrag
1	gL biotinyliert	1,25 µl
2	gH biotinyliert	1,25 µl
3	gL biotinyliert	2,5 µl
4	gH biotinyliert	2,5 µl
5	gL biotinyliert	5 µl
6	gH biotinyliert	5 µl

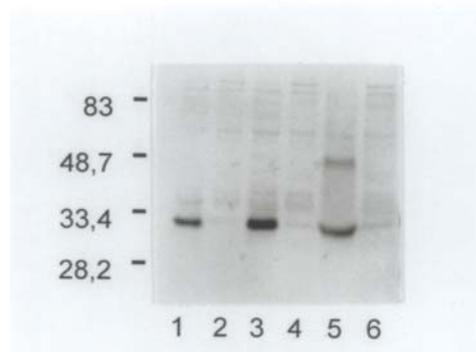


Abbildung 3: Nachweis von Glykoprotein L aus dem In vitro Transkriptions/Translationsprodukt des Vektors pEUKC1T7gL mit gL-spezifischem polyklonalem Kaninchenserum E24/7.

4.1.2. In vitro-Transkription-/Translation von gL aus pEUKC1T7gL unter Zugabe von Hundepankreasmikrosomen

Die posttranslationale Modifizierung des Glykoproteins L (Abspaltung des Signalpeptides, Glykosylierung etc.) wurde durch die Zugabe von Hundepankreasmikrosomen zum in vitro Transkriptions-/Translationsansatz untersucht. Im anschließenden Western-Blot konnte die Existenz modifizierter Formen von gL gezeigt werden. Diese Formen wiesen im Vergleich zum nicht modifizierten gL ein höheres Molekulargewicht auf (Abb. 2).

Spur	Spurbelegung
1	gL mit Zugabe von Hundepankreasmikrosomen
2	gL ohne Zugabe von Hundepankreasmikrosomen
3	gL+gH mit Zugabe von Hundepankreasmikrosomen
4	gL+gH ohne Zugabe von Hundepankreasmikrosomen

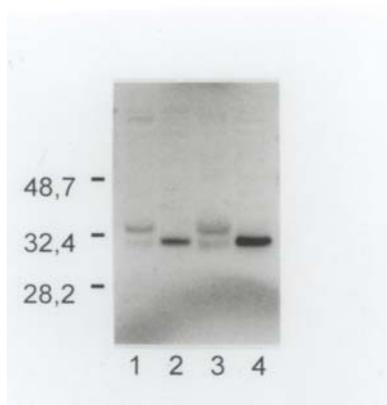


Abbildung 4: Modifizierung des Molekulargewichts von Glykoprotein L durch Zugabe von Hundepankreasmikrosomen zum In vitro Transkription-/Translationsansatz

4.1.3. Optimierung der Detektion über den Einbau von Bio-Lysin

Weitere Versuche dienten dazu, die Detektion von gL über den Einbau des biotinylierten Lysin mit Streptavidin-AP zu optimieren, da sich bei diesem Verfahren sehr viele unspezifische Banden darstellten. Dazu wurde nach dem Blotten die Membran mit drei unterschiedlichen Block- und Waschlösungen behandelt und anschließend mit Streptavidin-AP detektiert und miteinander verglichen (Abb. 5).

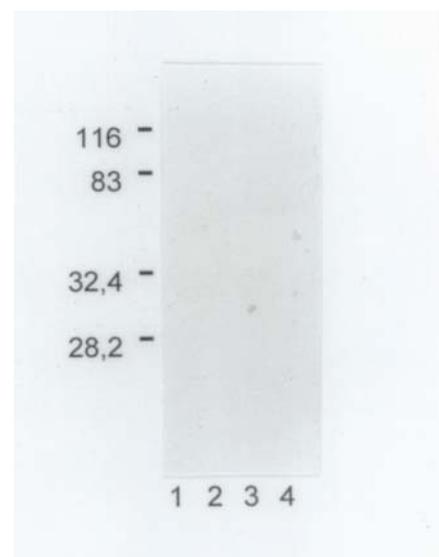
- Blocken mit TBS Tween 0,5 %
- Blocken mit TBS 3 % BSA
- Blocken mit PBS 3 % BSA

Qualitativ stellte sich die Renaturierung der Proteine mit TBS 3 % BSA als die beste Methode dar.

Detektion von gL über den Einbau von biotiniertem Lysin mit Streptavidin-AP

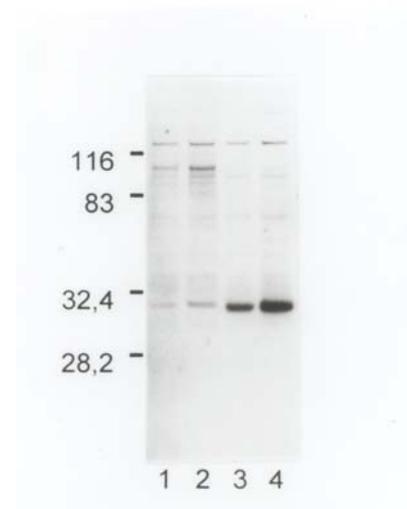
- Block mit TBS Tween 0,5 %

Spur	Spurbelegung	Auftrag
1	gH	1,25 µl
2	gH	4,5 µl
3	gL	1,25 µl
4	gL	2,5µl



-Blocken mit TBS 3 % BSA

Spur	Spurbelegung	Auftrag
1	gH	1,25 μ l
2	gH	4,5 μ l
3	gL	1,25 μ l
4	gL	2,5 μ l



Blocken mit PBS 3 % BSA

Spur	Spurbelegung	Auftrag
1	gH	1,25 μ l
2	gH	4,5 μ l
3	gL	1,25 μ l
4	gL	2,5 μ l

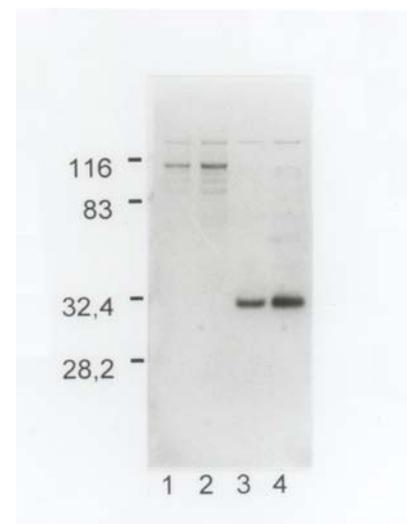


Abbildung 5: Detektion von gL über den Einbau von biotiniertem Lysin mit Streptavidin-AP

4.2. PCR-Amplifikation von gL

Für die weiteren Klonierungsschritte wurden die 672 Basenpaare der kodierenden Sequenz von gL mittels PCR (3.1.4.) amplifiziert. Als Zielsequenz diente das Plasmid pEUKC1T7gL. Mit Hilfe der PCR-Primer wurden dem PCR-Produkt gleichzeitig Schnittstellen für Restriktionsenzyme hinzugefügt: mit dem Vorwärtsprimer am N-terminalen Ende die Schnittstelle für EcoRI und am C-

Terminus mit dem Rückwärtsprimer die Schnittstelle für BamHI. Die Restriktionsstellen ermöglichten das spätere *In Frame*-Einklonieren von gL in den mit BamHI und EcoRI geöffneten Vektor pEGFPgDproT7. Nach Abschluss der PCR wurde das Produkt aus dem Amplifikationsansatz gereinigt und in der Agarosegelelektrophorese mit einem Molekulargewichtsmarker verglichen. Das nachgewiesene Produkt von ca.700 bp korrelierte dabei gut mit der errechneten Größe von 698 bp.

Sequenzen der für die PCR verwendeten Primer:

gL EGFP Eco RI-fw-Primer:

5`-GCG CGA ATT CGC CAC CAT GGG GAT TTT GGG TTG GGT C-3`

gL EGFP Bam HI-rw-Primer:

5`-CCG GTG GAT CCA GGC GCC` GGG AGT GGG GTC GT-3

Spur	Spurbelegung
1	Molekulargewichtsmarker 200bp
2	PCR-Produkt pEUKC1T7gL
3	Molekulargewichtsmarker 100bp

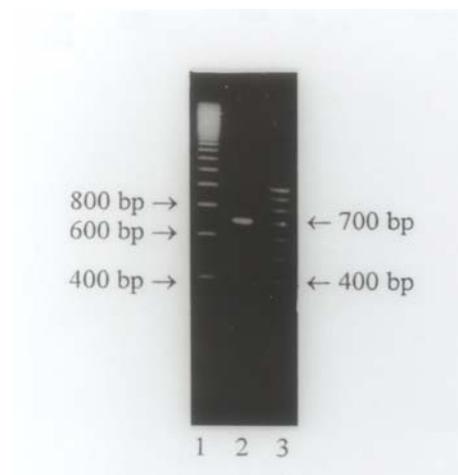


Abbildung 6: Agarosegelelektrophorese des PCR-Produkts pEUKC1T7gL

4.3. Klonierung des PCR-Fragmentes in pGEM-T

Zur Erleichterung der Klonierung des PCR-Produktes wurde das mittels PCR amplifizierte gL-Fragment zunächst in den Vektor pGEM-T kloniert.

Die Spuren 1, 3 und 5 enthielten eine Bande von ca. 3000 bp und eine Bande von weniger als 1000bp. Dies entsprach den erwarteten Bandengrößen und zeigte, dass die für den nächsten Klonierungsschritt benötigten Schnittstellen vorhanden waren. Das Vorhandensein eines korrekten Inserts wurde durch Doppelverdauung mit Eco R1 und Bam HI überprüft.

Spur	Spurbelegung
1	Molekulargewichtsmarker 1kb
2	pGEM-TgL Klon 1
3	pGEM-TgL Klon 3
4	pGEM-TgL Klon 4
5	pGEM-TgL Klon 9
6	pGEM-TgL Klon 10
7	Molekulargewichtsmarker 1kb



Abbildung 7: Agarosegelelektrophorese des Doppelverdaus von pGEM-TgL mit EcoRI und BamHI

4.4. Klonierung des gL in pEGFP-1gDproT7

Zur *In Frame*-Klonierung der gesamten gL-kodierenden Sequenz (672 bp, 224 Aminosäuren) vor die EGFP-Sequenz wurde der Vektor pEGFP-1gDproT7 mit Bam HI und EcoRI doppelverdaut, das Vektorfragment in der Agarosegelelektrophorese aufgereinigt und anschließend Vektor und Insert ligiert.

Das neu entstandene Plasmid pEGFPgDproT7gL (5274 bp) setzte sich aus den 698 bp des gL-PCR-Produktes und 4576bp des doppelverdauten pEGFP-1gDproT7 zusammen.

Die Klone 1,2,7 und 8 enthielten das Insert mit korrekter Orientierung. Klon 1 wurde in den weiterführenden Versuchen verwendet.

Spur	Spurbelegung
1	Molekulargewichtsmarker 1 kb
2-11	pEGFPgDproT7gL 1-10
12	Molekulargewichtsmarker 200 bp

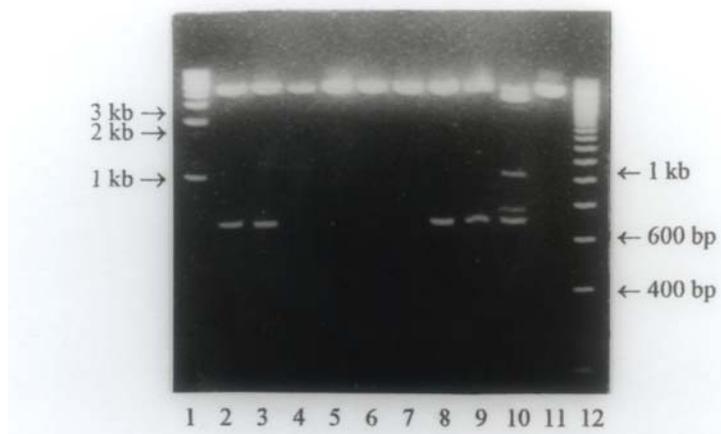


Abbildung 8: Agarosegelelektrophorese

des mit BamHI und EcoRI geschnittenen pEGFPgDproT7gL

4.5. Klonierung des Plasmids pEYFPgDproT7gL

Bei der Klonierung des Vektors pEYFPgDproT7gL wurde die EGFP-kodierende Sequenz gegen EYFP ausgetauscht. Die EGFP-Sequenz wurde mit BamHI und NotI aus dem Plasmid ausgeschnitten und die EGFP-freie Vektor-DNA im Aga-

rosegel aufgetrennt und aufgereinigt. Das Plasmid pEYFP-1 lieferte das EYFP-Fragment. Nach der Ligation erfolgte die Transformation der ligierten DNA in kompetente Bakterien E.coli DM-1 und Ausplattieren auf kanamycinhaltige Agarplatten.

Es wurden wieder 10 Bakterienkolonien den Platten entnommen und in 5 ml Übernachtkultur angezüchtet und zur Plasmidisolation verwendet. Um zu kontrollieren, ob die Plasmide das Insert enthielten, wurden sie mit BamHI und EcoRI doppelverdaut und im Agarosegel analysiert. Demnach waren die Klone 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 und 10 korrekt.

Klon 1 wurde in späteren Versuchen weiter verwendet.

Spur	Spurbelegung
1	Molekulargewichtsmarker 1 kb
2	pEGFPgDproT7gL 1
3	pEGFPgDproT7gL 2
4	pEGFPgDproT7gL 3
5	pEGFPgDproT7gL 4
6	pEGFPgDproT7gL 5
7	pEGFPgDproT7gL 6
8	pEGFPgDproT7gL 7
9	pEGFPgDproT7gL 8
10	pEGFPgDproT7gL 9
11	pEGFPgDproT7gL 10
12	Molekulargewichtsmarker 200 bp

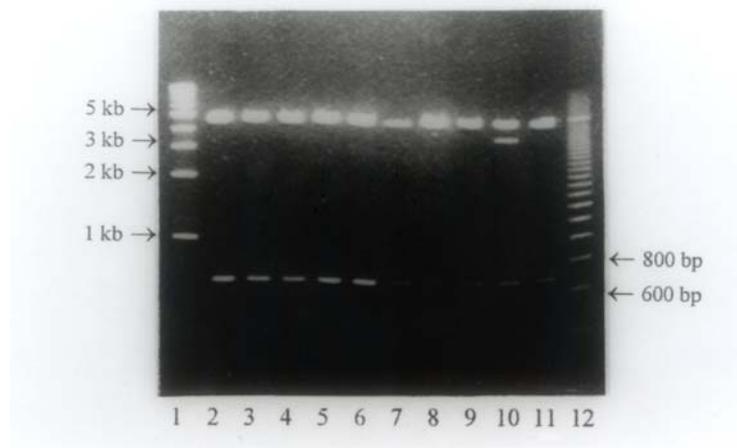


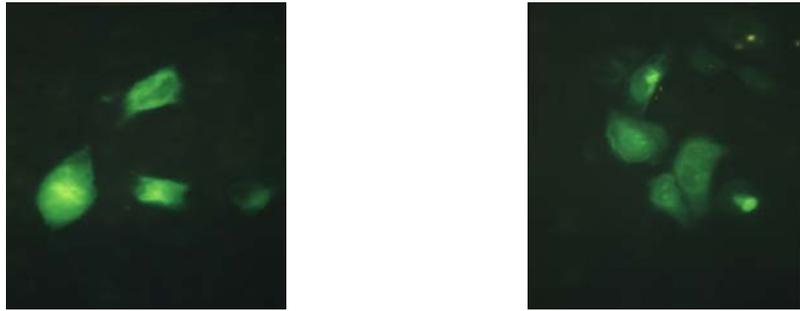
Abbildung 9: Agarosegelelektrophorese des mit BamHI und EcoRI geschnittenen pEYFPgDproT7gL

4.6. Transiente Expression der Konstrukte in animalen Zellen

4.6.1. Expressionsmuster in HeLa-Zellen

Zur Untersuchung der Funktionsfähigkeit der Fusionsproteine wurden HeLa-Zellen mit der rekombinanten DNA transfiziert. Die Expression der Proteine stand unter der Kontrolle des HSV-1 gD-Promotors.

Zur Induktion der Proteinexpression wurden die Zellen 18 bis 24 h nach der Transfektion mit HSV-1 infiziert und 24h inkubiert. Es wurde jeweils eine Kontrolle mit transfizierten, aber nicht HSV-1-infizierten Zellen angelegt. Die Zellen wurden anschließend mit Formaldehyd fixiert und mikroskopisch beurteilt. Nach der Überinfektion mit HSV-1 zeigten die Zellen eine ausgeprägte Autofluoreszenz, die überwiegend membranständig verteilt war. In der nicht infizierten Kontrollpopulation war keine Autofluoreszenz vorhanden. Zellen, die mit gH-negativem Virus infiziert wurden zeigten ebenfalls eine Autofluoreszenz, die jedoch eher im Zytoplasma lokalisiert war.



a)

b)

Abbildung 10:

- a) Transiente Expression von pEGFPgDproT7gL in HeLa-Zellen nach Infektion mit HSV-1 17+
- b) Transiente Expression von pEGFPgDproT7gL in HeLa-Zellen nach Infektion mit gH-negativer Virusmutante

4.7. Etablierung von Vero-Zelllinien mit induzierbarer Expression der Fusionsproteine

4.7.1. Herstellung von Vero-gLEGFP-Zellen

Zur stabilen Integration von pEGFPgDproT7gL-DNA in Vero-Zellen wurde diese mit Hilfe der Restriktionsendonuklease Alw44I linearisiert. Vero-Zellen, die einen Tag vorher in einer Kulturschale (mit 35 mm Durchmesser) ausgesät und zur Semikonfluenz gebracht worden waren, wurden mit linearisierter Vektor-DNA transfiziert. Die Selektion gLEGFP-positiver Zellklone erfolgte wie in dem Kapitel Material und Methoden beschrieben.

Insgesamt wurden 22 Klone, 13 davon mit induzierbarer gLEGFP-Expression selektiert. Die Stärke der Autofluoreszenz wurde mit Punktzahlen 1 (schwach) bis 3 (stark) beurteilt. Klon 4.10A zeigte eine sehr starke, induzierbare Autofluoreszenz und wurde zur Weiterkultur verwendet. Ein anderer Klon, bezeichnet mit 4.9C, zeigte eine starke Autofluoreszenz auch ohne HSV-1-Überinfektion. Dieser Klon wurde ebenfalls weiterkultiviert.

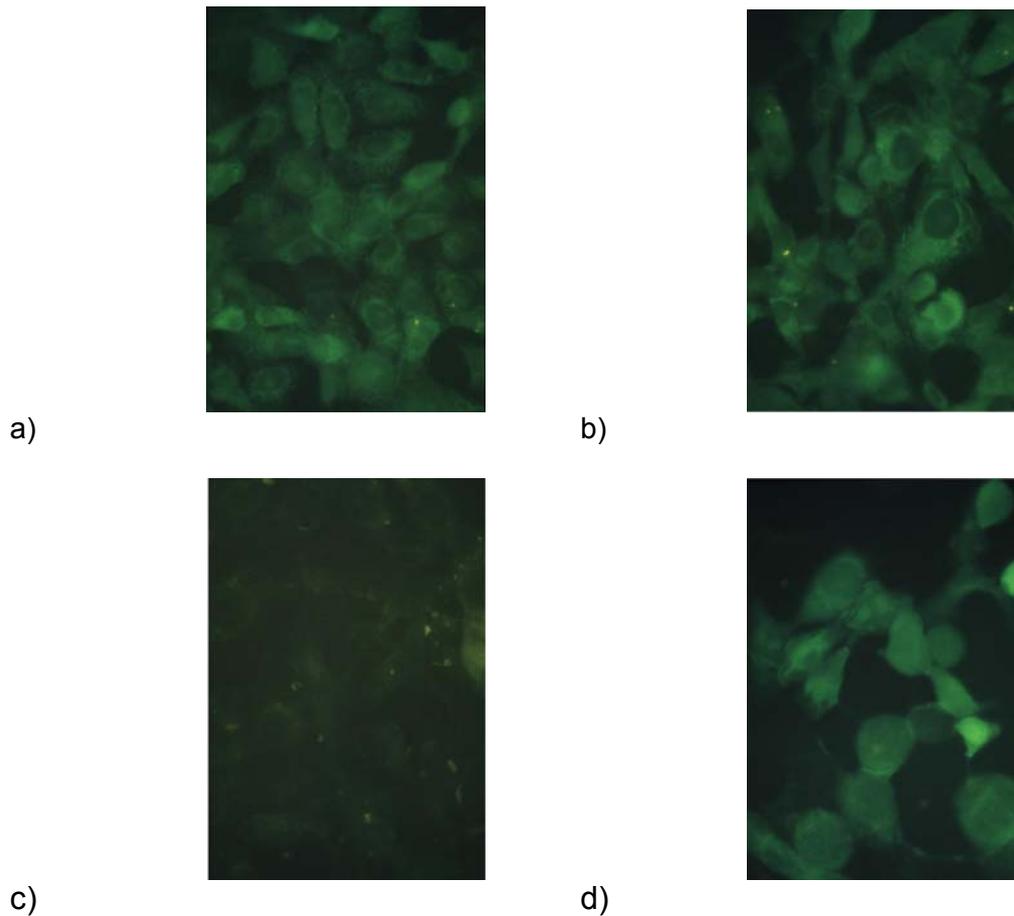


Abbildung 11: Vero-gLEGFP-Zellen:

- a) Zelllinie 4.9C nicht infiziert
- b) Zelllinie 4.9C nach HSV-Infektion
- c) Zelllinie 4.10A nicht infiziert
- d) Zelllinie 4.10A nach HSV-Infektion

4.7.2. Herstellung von Vero-gLEYFP-Zellen

Um stabile Zelllinien mit induzierbarer gLEYFP-Expression zu erzeugen, wurde die pEYFPgDproT7gL-DNA ebenfalls mit Alw44I linearisiert und die Transfektion wie unter 4.7.1. beschrieben. Es wurden 64 Zellklone mit Geneticin-Resistenz selektiert, wobei die Klonalität in vielen Fällen nicht eindeutig war. Alle Klone wurden auf Expression von gLEYFP nach HSV-1-Überinfektion getestet. Auch hier wurde die Autofluoreszenz mit Punktzahlen bewertet. Bei 37 Klonen konnte eine Autofluoreszenz festgestellt werden, die zehn besten davon

wurden zunächst in kleinen Flaschen kultiviert. Davon zeigten 3 Klone eine starke Autofluoreszenz, ein weiterer Klon mit der Bezeichnung 4.4F2 zeigte die bislang stärkste beobachtete Autofluoreszenz und wurde mit 4 Punkten bewertet. Da der Klon 4.4F2 im Laufe der Zeit sich auch durch das günstigste Wachstumsverhalten auszeichnete, während viele andere Klone in ihrem Wachstum stagnierten und degenerierten, wurde er für die weiteren Experimente verwendet.

4.7.3. Nachweis der gLEGFP- und gLEYFP-Fusionsproteine im Western-Blot

Aus den Kulturen gLEGFP- und gLEYFP-exprimierender Zellen wurden nach Infektion mit HSV-1 sowie einer gH-negativen Virusmutante Zellpellets gewonnen. Die Proteine des Zellysats wurden über ein 10%-iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und geblottet (siehe Abb. 12 und 13). Ein Teil der Proben wurde vor der Auftrennung mit Glucosidase H oder F verdaut. Für beide Konstrukte konnte mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen GFP bzw. gL (Kaninchenserum E24/7) die Existenz eines Proteins mit einem MG von ca. 65 kDa nachgewiesen werden. Bei der Zell-Linie 4.9.C konnte das Fusionsprotein auch ohne vorherige HSV-1-Infektion identifiziert werden, da diese Zelllinie das Protein stabil exprimiert. Der Vergleich der Banden mit und ohne HSV I-Infektion ließ eine leichte Veränderung des Glycosylierungsmusters nach HSV-1-Infektion erkennen. Dieser Effekt war nach Infektion mit gH-negativem Virus nicht nachweisbar.

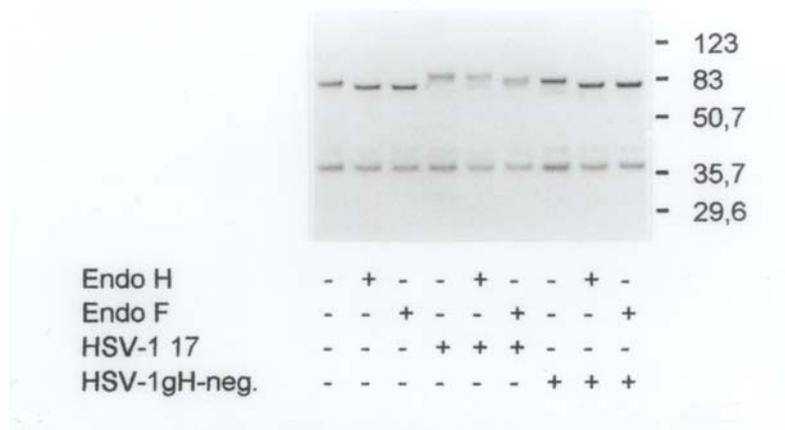


Abbildung 12: Nachweis des Fusionsproteins gLEGFP in der Zelllinie 4.9C mit und ohne Infektion mit HSV-1 Virus (stabile Expression). Detektion mit monoklonalem GFP-spezifischen Antikörpern.

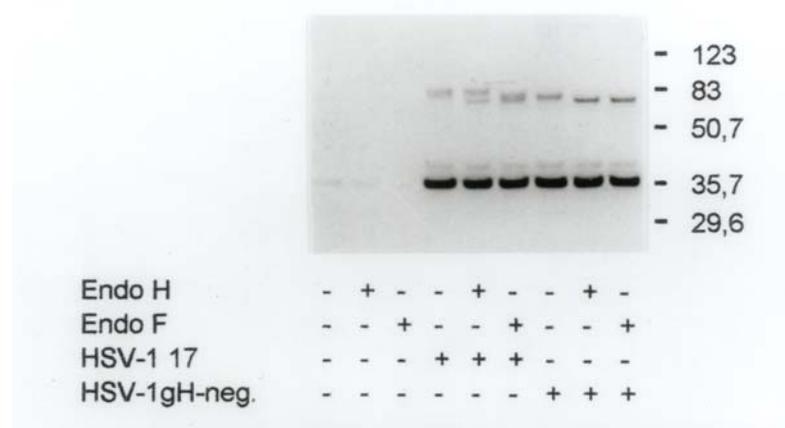
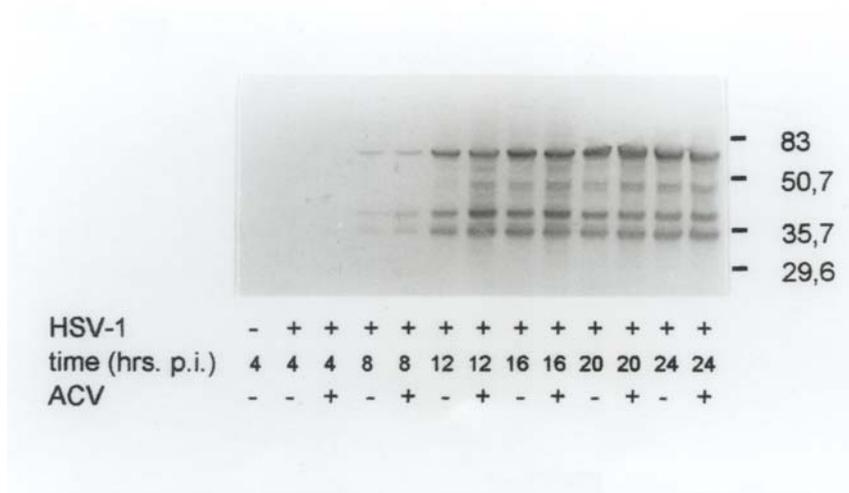


Abbildung 13: Nachweis des Fusionsproteins gLEYFP in der Zelllinie 4.10A nach Infektion mit HSV-1 Virus (virusinduzierte Expression). Detektion mit monoklonalem GFP-spezifischen Antikörpern.

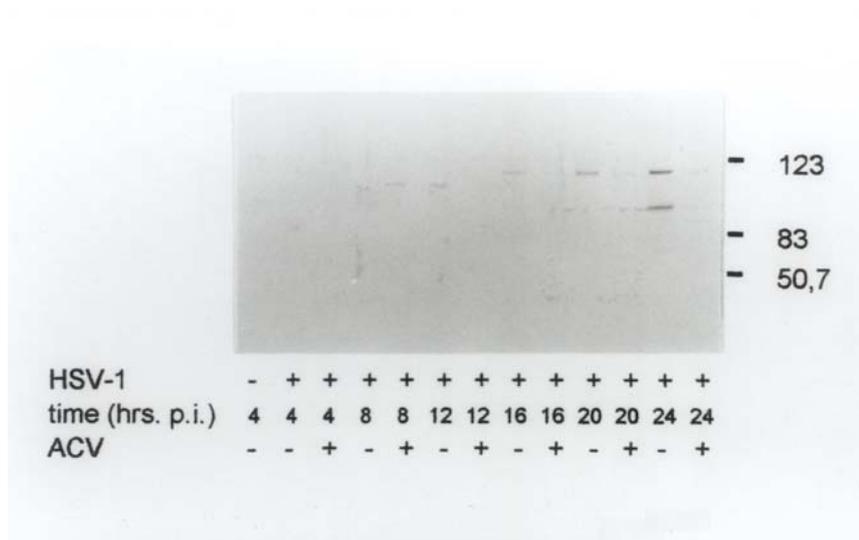
4.7.4. Untersuchung der Zeitkinetik der Fusionsproteinexpression

Um das zeitliche Expressionsmuster zu bestimmen, wurden die Zellpellets aus gLEYFP-exprimierenden Zellen des Klonen 4.4.F2 jeweils 4, 8, 12, 18, 20 und 24 Stunden nach der Infektion mit HSV-1 geerntet. Parallel dazu wurden auch Zellen geerntet, bei denen vor der Infektion mit HSV-1 die Zugabe von Aciclovir erfolgte. Nach Aufbereitung und Trennung mittels SDS-PAGE wurden gL-EGFP-Fusionsproteine sowie die viralen Proteine VP5 und gD im Western-Blot mit monoklonalen Antikörpern detektiert (siehe Abb.14). Das Fusionsprotein trat erstmalig 8 Stunden nach der Infektion auf, wobei die Menge des durch die Zellen synthetisierten Proteins nach 12- bis 18-stündiger Inkubation ihr Maximum erreichte. Die Hemmung der viralen DNA-Synthese durch Aciclovir führte zu keiner Minderung der gLEYFP-Expression. Das zeitliche Muster entsprach somit dem eines E/L-Proteins. Das zeitliche Auftreten und das Expressionsmaximum der E/L-Proteine gD und VP 5 war erwartungsgemäß etwa synchron mit gLEYFP. Allerdings ließ sich die Synthese von VP5 durch Aciclovir hemmen.

1) Detektion mit monoklonalem GFP-Antikörper



2) Detektion mit VP5-spezifischem Antikörper



3) Detektion mit gD-spezifischem monoklonalem Antikörper (IV-4-1)

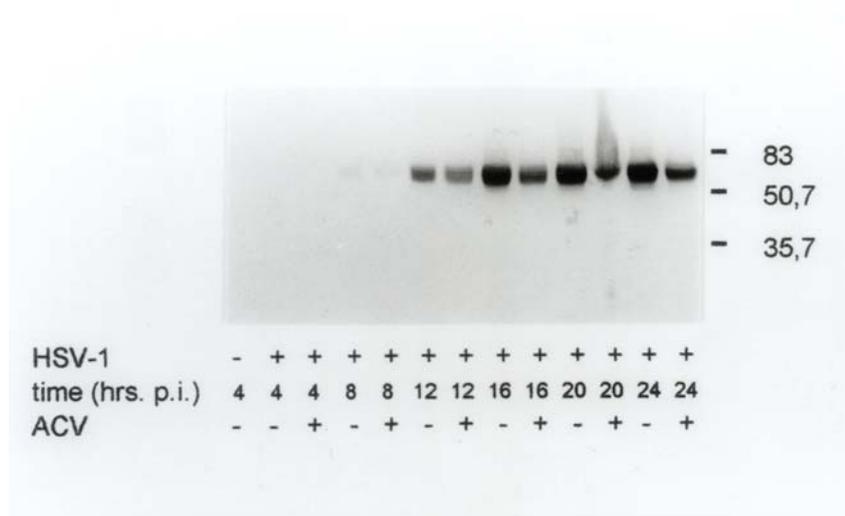


Abbildung 14: Zeitkinetik der Fusionsproteinexpression nach der Infektion der Zellen mit HSV-1 jeweils mit und ohne Zugabe von Aciclovir

4.7.5. Nachweis der Fusionsproteine in den Viruspartikeln

Die Untersuchung des Einbaus der Fusionsproteine in die Viruspartikel wurde mit dem gLEYFP-exprimierenden Zellklon 4.4.F2 vorgenommen. Nach der Infektion der Zellen mit HSV-1 wurde eine Viruspräparation durchgeführt und freie Viruspartikel aufgereinigt. Bei der mikroskopischen Untersuchung des Viruspellets unter UV-Licht war eine deutliche Autofluoreszenz sichtbar (siehe Abb.15).

Das Viruspellet wurde zunächst mittels SDS-PAGE und Western-Blot auf das Vorhandensein von gL untersucht. Die Detektion erfolgte wie oben beschrieben mit einem GFP-spezifischen monoklonalen Antikörper. Die im Western-Blot sichtbaren Banden zeigten, dass das Fusionsprotein gLEYFP in die Viruspartikel eingebaut wurde. Als Negativkontrolle wurde eine Viruspräparation aus einer nicht modifizierten Zellkultur aufgetragen.

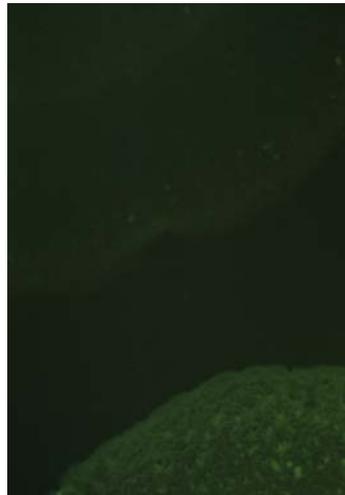


Abbildung 15: Viruspellet aus gLEYFP-exprimierenden Zellen, welche mit HSV-1 infiziert wurden.

Spur	Spurbelegung
1	Viruspellet aus einer gLEYFP-exprimierenden Zellkultur
2	Zellysat aus gLEYFP-exprimierenden Zellen
3	Viruspellet aus einer nicht modifizierten Zellkultur

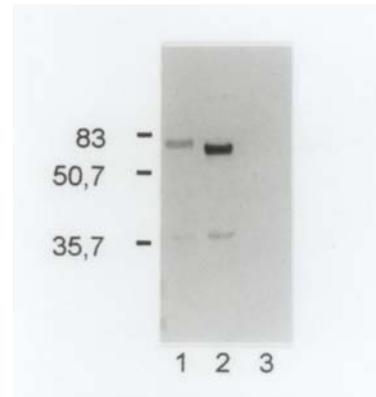


Abbildung 16: Nachweis von gLEYFP mit GFP-spezifischen monoklonalem Antikörper im Viruspellet

4.7.6. Kopräzipitation von gLEYFP mit dem gH-spezifischen monoklonalen Antikörper LP11

Für die Kopräzipitation wurde das Zellysat der HSV-infizierten Zelllinie Vero gLEYFP 4.4.F2 verwendet. Dem Überstand wurde der gH-spezifische monoklonale Antikörper LP11 zugegeben, um Antigen–Antikörper-Komplexe zu erhalten. Der im nächsten Schritt erfolgte Zusatz von Protein G-Beads diente der Bindung der Ag-Ak-Komplexe. Nach mehreren Waschschrinen (s. Materialien und Methoden) wurden die Komplexe geblottet und mit GFP-spezifischen Antikörpern detektiert. Eine detektierbare gL-EYFP-Bande im Western-Blot zeigte an, dass gLEYFP zu der Komplexbildung mit gH befähigt ist. Bei der entsprechenden Kontrolle ohne Zugabe von LP11 konnten keine Proteinkomplexe gebunden und von Anti-GFP-Antikörpern erkannt werden.

Spur	Spurbelegung
1	Kopräzipitat aus LP11, gH/gLEYFP, Detektion mit Anti-GFP-AK
2	Zelllysat ohne Zugabe von LP11, Detektion mit Anti-GFP-AK

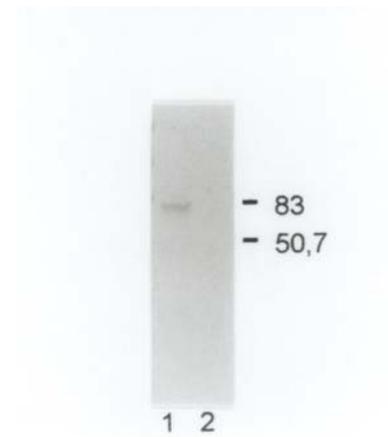


Abbildung 17: Nachweis der Komplexbildung zwischen gLEYFP und gH durch Copräzipitation mit gH-spezifischen monoklonalen Antikörper LP11 und Detektion mit GFP-spezifischem Antikörper.

5. Diskussion

Der Prozess der HSV-Infektion, der die Interaktion viraler und zellulärer Proteine, die Synthese der Viruspartikel und deren intrazellulären Transport einschließt, ist noch nicht vollständig geklärt. GFP, ein nicht zytotoxisches Protein, eröffnet die Möglichkeit von Echtzeituntersuchungen in lebenden Zellen. Auf diese Weise kann man mit Fusionsproteinen, die N- oder C-terminal GFP tragen, die Lokalisation von Proteinen in lebenden Zellen bestimmen. Die Analyse der Ausbreitung von HSV-1 in Zielzellen über die Untersuchung des zeitlichen und räumlichen Verteilungsmusters der Virusproteine mittels autofluoreszierender Hüll-, Tegument- und Kapsidproteine sowie deren Interaktionen untereinander stellen das Ziel unseres Forschungsprojektes dar. Die konkrete Aufgabe dieses Teilprojektes bestand in der Herstellung eines Fusionsproteins aus gL und EGFP/EYFP. Die Analyse der Funktion des Fusionsproteins und des Verteilungsmusters während des Infektionszyklus und die anschließende Beurteilung des Einflusses des GFP-Anteils erforderte die Herstellung von Zelllinien, die eine stabile bzw. eine regulierbare Expression der Fusionsproteine erlaubten.

5.1. Posttranslationale Modifikation von gL

Zu Beginn der Arbeit wurde das Ausgangskonstrukt pEUKC1T7gL auf Intaktheit der gL-Sequenz überprüft. Dies geschah durch die *in vitro*-Transkription/-Translation. Krieg und Melton haben 1987 diese Methode ausführlich beschrieben. Ein intakter Leserahmen und ein Protein mit einem Molekulargewicht von 30-32 kDa wurde nachgewiesen. Dubin und Jiang (1995) detektierten die 30 kDa-Form des gL im Zellkulturüberstand sowie im Zelllysat von transient transfizierten L-, COS- und Vero-Zellen. Im Zelllysat von COS- und Vero-Zellen konnten sie zusätzlich einen 25-28 kDa-Prekursor nachweisen (38).

Die Koexpression von gH und gL ist für ein normales posttranslationales Prozessieren und den intrazellulären Transport von beiden Glykoproteinen erforderlich. gH und gL sind essentiell für die Infektion *in vitro* und vermitteln den

Prozess des Viruseintrittes in Zellen und der viralen Zell-zu-Zell-Ausbreitung des Virus (29, 70, 109)

Hutchison et al (1992) fanden im Zellextrakt von gL/gH-kotransfizierten Vero-Zellen neben der 30 kDa-Form noch eine 40 kDa-Form (70). Im Zellextrakt von nur mit gL transfizierten Zellen war diese Form weniger vertreten und bei der Infektion mit einer gH-negativen Virusmutante fehlte sie. Die 24 kDa-Form ließ sich ausschliesslich in Zellen nachweisen, in denen die posttranslationale Glycosylierung der Proteine durch die Behandlung mit Tunicamycin verhindert wurde. Diese Form entspricht dem errechneten Molekulargewicht des gL vor der Glycosylierung. Es wird unmittelbar nach der Synthese zur 30 kDa-Form prozessiert. Dies deutet darauf hin, dass gL abhängig vom Zelltyp und der Anwesenheit von gH unterschiedlich prozessiert wird (79, 80).

5.2. Komplexbildung mit gH

gL und gH bilden einen funktionellen heterooligomeren Komplex, der auf der Virushülle und auf der Oberfläche von virusinfizierter Zellen exprimiert wird. Die Beobachtung, dass die Komplexbildung für die korrekte Faltung, die Prozessierung und die Zellmembran-Expression von gH notwendig ist, legte nahe, dass gL essentiell für die Replikation von HSV-1 ist (70). In Abwesenheit von gL wird gH inkomplett prozessiert, ist fehlgefaltet und wird intrazellulär zurückgehalten (3, 14, 15, 43, 61, 62). Ähnlich verhält sich gL. gL wird in Abwesenheit zu einem reifen 30-40 kDa Protein prozessiert und ins Zellmedium sezerniert. Dies wurde in Experimenten gezeigt, in denen Zellen mit einer gH-negativen Virusmutante infiziert wurden und dementsprechend das Glykoprotein gH nicht gebildet werden konnte (47, 109).

Dass das Glykoprotein gL mit einem anderen Protein assoziiert ist, zeigten weitere Versuche, in denen zunächst mittels eines spezifischen Antiserum überraschenderweise nicht nur ein 30-40 kDa Protein, sondern auch ein weiteres ca. 100–110 kDa Protein immunpräzipitiert wurde. Weitere Experimente zeigten, dass es sich um gH handelte (70, 85).

Mögliche Auswirkungen des Fusionsproteins gLEYFP auf die Komplexbildung mit gH wurden in Anlehnung an die Experimente von Hutchinson (1992) unter-

sucht. Aus dem Zelllysate von gLEYFP exprimierenden Verozellen wurde mit einem monoklonalen Antikörper gegen gH (LP11) ein Protein kopräzipitiert, welches mit GFP-spezifischem Antiserum detektiert wurde und ein Molekulargewicht von ca. 70-80 kDa besaß (Abb. 15). Dies bedeutete, dass das Fusionsprotein gLEYFP zur Komplexbildung mit gH fähig ist.

Inwiefern der EYFP/EGFP-Anteil des Fusionsproteins den intrazellulären Transport und die Prozessierung von gL beeinflusst, zeigten die Western-Blot Analysen der Fusionsprotein-exprimierenden Zelllinien 4.9C nach HSV-1 Infektionen sowie nach Infektion mit einer gH-negativen Virusmutante. Entsprechend den Erwartungen ließ sich eine leichte Veränderung des Glycosilierungsmusters nach HSV-1-Infektion erkennen (Abb.10 und 11). Nach der Infektion mit einem gH-negativen Virus war dieser Effekt nicht nachweisbar. Hutchinson zeigte bereits, dass die Prozessierung von gL zum 40 kDa-Protein abhängig von der gL-/gH-Komplexbildung ist. Bei der Infektion der Zellen mit Vaccinia-gL-Virus wurde größtenteils gL in der 30 kDa-Form synthetisiert. Bei der Koinfektion der Zellen mit Vaccinia-gL und Vaccinia gH-Virus wurden ca. gleiche Mengen der 30 und der 40 kDa Form des gL synthetisiert.

5.3. Zeitlicher Verlauf der Expression

Nach der zeitlichen Aufteilung der Virusproteine im Infektionszyklus gehört das Glycoprotein L zu der Gruppe der Early/Late Proteine (auch $\beta\gamma$ oder γ_1 genannt). Ihre Expression ist von dem Vorliegen funktioneller α -Proteine abhängig und im Gegensatz zu den γ_2 -Proteinen unabhängig von einer Replikation der viralen DNA. Das gL-Genprodukt konnte 4 Stunden nach Virusinfektion im Zelllysate nachgewiesen werden. Nach 12 h erreichte die Expression ihr Maximum (7, 30). Als Promotor wurde der gD-Promotor aufgrund seiner Eigenschaften ausgewählt: das Glykoprotein D gehört ebenfalls zu der Gruppe der γ_1 -Proteine und gD-Gen wird relativ früh im Infektionszyklus transkribiert (4, 89, 116, 130). Das Präcursorprotein des gD lässt sich 2h nach der Infektion nachweisen. Die Eigenschaften des gD-Promotors wurden durch mehrere Arbeiten aus unserer Forschungsgruppe untersucht (Hafezi Diss. 2002, Heid Diss. 2004). Dort erwies

sich der gD-Promotor als ein starker, spezifisch durch HSV-1 aktivierbarer Promotor mit einem frühen Zeitpunkt der Aktivierung durch das Virus. Hier wurde neben der zeitlichen Aktivität auch der Einfluss von Aciclovir auf die Aktivität des Promotors untersucht.

In den Experimenten wurde das Fusionsprotein gLEGFP bezüglich seines zeitlichen Auftretens im Infektionszyklus untersucht und mit dem Wildtypprotein verglichen. Das Fusionsprotein trat erstmalig 8 h nach der Infektion auf und erreichte das Expressionsmaximum 12-18 h nach der Infektion. Die Hemmung der DNA-Synthese durch Aciclovir führte zu keiner Minderung der Expression. Dies zeigt, dass die Synthese des Fusionsproteins von dem Vorliegen funktionsfähiger Nachkommen-DNA wie beim Wildtyp gL unabhängig ist. Dies entspricht einer Early/Late-Charakteristik (γ_1). In den Arbeiten von Elliot und O'Hare (41) zum GFP-VP22 Fusionsprotein wurde gezeigt, dass die Kinetik von VP22 und GFP-VP22 sehr ähnlich ist. Beide Proteine konnten zum ersten Mal 6 Stunden nach der Infektion detektiert werden. Des Weiteren wurde hier die Expressionskinetik von 3 anderen, unterschiedliche Genklassen repräsentierenden Proteinen, nach der Infektion mit GFPVP22 enthaltenden Virus (166 v) untersucht. Sowohl für 166 v wie auch für wt-HSV war die Expressionskinetik für das Immediate-Early Gen IE110, das Early Gen TK und das Late Gen VP16 identisch. Dies legt nahe, dass die GFPVP22-Virusreplikation genauso effizient ist wie beim Wildtyp-Virus und dass der GFP-Anteil in diesem Fall keinen Einfluss auf die Replikationskinetik des Virus nimmt.

5.4. Verteilungsmuster des Fusionsproteins

Die Lokalisierung viraler Proteine erfolgte vor der Einführung von GFP u.a. mittels Immunfluoreszenzmikroskopie in fixierten Zellen. Die Methode der indirekten Immunfluoreszenz beruht auf der Identifizierung der Antigene mit spezifischen Antikörpern. Im zweiten Schritt werden diese mit weiteren Antikörpern sichtbar gemacht. Hutchison et al wiesen 1992 mittels indirekter Immunfluoreszenz eine vorwiegend membranständige Verteilung des gH/gL-Komplexes nach. Dubin und Jiang lokalisierten 1995 gL mittels Immunfluoreszenzmikro-

skopie an der Zelloberfläche von gL/gH-kotransfizierten Zellen. Im Unterschied zu den Arbeiten von Hutchinson handelte es sich hier um einen Nachweis mittels gL-spezifischer Antikörper, während Hutchison gH-spezifische Antikörper verwendete. Entsprechend den Erwartungen wurde in allein mit gL-transfizierten Zellen kein membranständiges gL nachgewiesen. Bei der Kotransfektion mit gH und gL war eine eindeutige membranständige Verteilung zu beobachten. Für einige Experimente wurden von Dubin und Jiang 1995 Plasmide verwendet, die für ein verkürztes gH kodieren. Die verkürzte Proteinform endete bei AS792 und besaß nicht die Transmembranregion und zytoplasmatische Domäne. In der Immunfluoreszenzmikroskopie von Zellen die mit gL und verkürztem gH transfiziert wurden konnte keine membranständige Verteilung der Proteine beobachtet werden. Mittels Immunpräzipitation mit gL-Antiserum ließ sich nachweisen, dass gL in das Zellkulturmedium im Komplex mit der verkürzten gH-Mutante sezerniert wird. Dies lieferte zusätzlich den Beweis, dass gL als Resultat einer Komplexbildung mit gH membranassoziiert ist und der gH/gL-Komplex über die gH-Membrandomäne in der Plasmamembran verankert ist. Der Nachweis des EGFP/EYFP-Fusionsproteins in transfizierten Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie stellt eine weitere direkte Methode zur Analyse des Verteilungsmusters des Glykoproteins gL dar. Diese Methode eröffnet die Möglichkeit, das Fusionsprotein, das ein GFP-Anteil trägt, in lebenden Zellen zu lokalisieren und ggf. Echtzeituntersuchungen durchzuführen (35, 41, 45, 46, 74, 87).

Die transiente Expression der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten rekombinanten DNA erfolgte in Hela-Zellen. Die Expressionsrate der Fusionsproteine gLEGFP/gLEYFP, beurteilt nach der Stärke der Autofluoreszenz, wurde als hoch eingeschätzt, wobei die absolute Zahl transfizierter Zellen niedrig war. Dabei zeigte sich eine vorwiegend membranständige Verteilung der fluoreszierenden Proteine.

Um die Untersuchungsbedingungen für weitere Experimente (Zeitkinetik der Expression, Komplexbildung mit gH, Inkorporation ins Virus) konstant zu halten, wurden Vero-Zelllinien mit stabiler und mit regulierbarer Expression hergestellt. Auch hier zeigte sich eine vorwiegend membranständige Autofluoreszenz, die

allerdings im Vergleich zur transienten Expression etwas weniger ausgeprägt war.

5.5. Inkorporation des Fusionsproteins in die Viruspartikel

In der Literatur sind bereits funktionsfähige EGFP-Fusionskonstrukte mit HSV-Proteinen beschrieben. 1998 zeigte P. Desai und S. Person (35), dass sich funktionsfähige Fusionskonstrukte mit dem viralen Kapsidprotein VP26 (UL 35) erzeugen lassen und dass sich an Stelle des wt-Proteins VP26-GFP exprimierende Virusmutanten herstellen lassen. Ähnliche Ergebnisse mit EGFP und dem Tegumentprotein VP22 erzielten 1999 G. Elliot und P. O'Hare (41). 2001 konstruierten E. Lorentzen et al aus unserer Arbeitsgruppe ein Fusionsprotein aus gH und EGFP. Das rekombinante Protein wurde in Viruspartikel eingebaut, war zur Komplexbildung mit gL fähig und wurde von den gH-spezifischen monoklonalen Antikörpern LP11 und 52S erkannt (87).

Die Tatsache, dass der EGFP/EYFP-Anteil des Fusionsproteins das Verteilungsmuster des gL/gH-Komplexes nicht veränderte, führte zur Überlegung, ob das Fusionsprotein auch in die Viruspartikel eingebaut wird und die Funktionen des wt-Proteins bei der Virusreplikation übernehmen kann. In dem dazu durchgeführten Test wurde nach der HSV-1 Infektion der gLEYFP exprimierenden Zelllinie 4.4F2 eine Viruspräparation und Aufreinigung durchgeführt. Bei der mikroskopischen Untersuchung des Viruspellets unter UV-Licht zeigte sich eine deutliche Autofluoreszenz (Abb. 13). Dies deutete darauf hin, dass das Fusionsprotein in die Viruspartikel eingebaut wird. In der Western-Blot-Auftrennung der Virusproteine konnte das Fusionsprotein mit GFP-spezifischem Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 14). Die Komplexbildung zwischen gLEYFP und gH wurde durch Kopräzipitation mit gH-spezifischen monoklonalen Antikörper LP11 nachgewiesen (Abb.15).

5.6. Intrazellulärer Transport von Virionen und Ausblick

Herpesviruspartikel verlassen den Zellkern durch "budding" (knospen) an der inneren Kernmembran (28). Der weitere Weg ist bis heute nicht endgültig ge-

klärt. Es existieren zwei unterschiedliche Modelle der Virusausschleusung. Die Hypothese von Stackpole (deenvelopment-reenvelopment) (120) besagt, dass umhüllte Viruspartikel mit der äußeren Kernmembran fusionieren und so hüllfreie Nucleokapside ins Zytoplasma gelangen. Die nackten Nucleokapside orientieren sich dann in Richtung des trans-Golgi-Netzwerkes. Teile der trans-Golgi-Zisternen mit integrierten reifen Glykoproteinen bilden um die Nucleokapside bilamelläre Transportvesikel. Dabei bildet die innere Membran diese Transportvesikels die engültige Hülle des Virus, während die äußere Membran mit der Zellmembran fusioniert. Nach dem alternativen Modell von Johnson und Spear (76, 77) wandern umhüllte Virionen aus dem Perinuclearraum über das Lumen des ER mittels Vesikeltransport zum Golgi-Apparat, wo die Glykoproteine weiter prozessiert werden. Die Virionen werden anschließend zur Zelloberfläche transportiert und unter Verschmelzung der Transportvesikel mit der Zellmembran freigesetzt. Die Ausbreitung der Viren durch Zell-zu-Zell-Kontakte oder Zellfusion ist ebenfalls möglich.

Mittlerweile sind mehrere Publikationen, die Rückschlüsse auf die Virusroute in den Zellen erlauben, erschienen (71, 72, 90, 117). Mittels Addition bestimmter Sequenzen an virale Glykoproteine kann eine Retention dieser Glykoproteine in den Zellorganellen ER und trans-Golgi-Netzwerk erzielt werden (14, 71, 72). So bewirkte die Addition der Sequenz KKSL zum zytoplasmatischen Teil von gH die Retention des Proteins im ER. Die Konsequenz war, dass Nachkommenviren kein detektierbares gH enthielten und nicht infektiös waren. Dabei war auffällig, dass die Hülle der Virionen von der post-ER-Komponente dem Golgi-Apparat, der post Golgi-Vesikel oder der Plasmamembran stammte. Diese Daten sind schwer mit dem Modell von Johnson und Spear in Einklang zu bringen, in dem die Hülle, die beim budding durch die innere Kernmembran gebildet wird, vom Virus während der Ausschleusung über Vesikeltransport beibehalten wird. Ähnliche Daten mittels Markierung von gD wurden von Whiteley et al 1999 publiziert (130).

Die Markierung einzelner viraler Proteine bei gleichzeitiger Markierung der Zellorganellen mittels unterschiedlich leuchtender GFP-Derivate könnte zur endgültigen Klärung der Viruswanderung durch die Zelle beitragen. Der Prozess der

Virusausschleusung von der Bildung der Kapside im Kern bis zum Austritt aus der Zelle wurde von Desai et al. 1998 (35) mittels VP26-GFP tragender Virusmutante erstmals direkt visualisiert und photographisch dokumentiert. Die Zellen zeigten zunächst eine punktuelle Kernfluoreszenz, später eine generalisierte zytoplasmatische und nukleare Fluoreszenz einschließlich der Fluoreszenz an den Zellmembranen. Die VP26-EGFP/ECFP-Konstrukte wurden von A. Heid aus unserer Arbeitsgruppe analysiert, wobei bezüglich des Verteilungsmusters und der zeitlichen Änderung der Lokalisation vergleichbare Ergebnisse erzielt wurden.

Die Fusionsproteine gLEGFP/gLEYFP zeigen eine vorwiegend membranständig lokalisierte Verteilung. Die Visualisierung der Virusausschleusung über gLEGFP/gLEYFP tragende Viren gehörte nicht mehr zu den Aufgabenstellungen dieser Arbeit. Ein Transkomplementationsversuch mit gL-negativen Virusmutanten könnte in weiteren Experimenten die Frage beantworten, ob das Fusionsprotein vollständig die Funktion des wt-Proteins übernimmt.

6. Zusammenfassung

Herstellung und Charakterisierung von Fusionsproteinen aus GFP und Glykoprotein L (gL) von Herpes simplex-Virus Typ 1 (HSV-1)

Glykoprotein L (gL) von HSV-1 bildet mit Glykoprotein H (gH) einen membranständigen Komplex, welcher an der Penetration und der Zell-zu-Zellausbreitung beteiligt ist. Der Komplex bewirkt zugleich die Bildung neutralisierender Antikörper. Die Herstellung eines Fusionsproteins aus gL und EGFP (enhanced green fluorescent protein) bzw. EYFP (enhanced yellow fluorescent protein) bot die Möglichkeit, das Expressionsmuster in animalen Zellen sowie sein Verhalten bei der Virusreplikation zu untersuchen.

Hierzu wurde das mittels PCR aus dem Ausgangsvektor pEUKT7C1gL amplifizierte gL-Gen in den Vektor pEGFPgDproT7 kloniert. Um einen gelb fluoreszierenden Fusionskomplex zu erhalten, wurde die EGFP-kodierende Sequenz gegen die EYFP-kodierende Sequenz ausgetauscht. Beide Konstrukte erlaubten die Expression des Fusionsproteins unter der Kontrolle des HSV-1 gD-Promotors.

Zuerst wurde eine transiente Expression der Fusionsproteine in HeLa-Zellen durchgeführt. Nach der Überinfektion mit HSV-1 wiesen die Zellen eine ausgeprägte Autofluoreszenz auf, die überwiegend membranständig verteilt war. Des Weiteren wurden Zelllinien, die das grün bzw. gelb fluoreszierende Fusionsprotein stabil unter der Kontrolle des viralen Promotors exprimierten, etabliert.

Beide Fusionsproteine (ca. 65 kDA) konnten im Western-Blot mit EGFP-spezifischen monoklonalen Antikörpern nachgewiesen werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das gL-Fusionsprotein in die Virushülle eingebaut wird. Wurde die virale DNA-Synthese durch Aciclovir gehemmt, so zeigte sich keine Minderung der gLEGFP-Expression. Das zeitliche Muster der Expression entsprach somit dem eines *Early/Late-Proteins*.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Ackermann, M.; Longnecker, R.; Roizman, B.; Pereira, L. (1986). Identification, properties, and gene location of a novel glycoprotein specified by herpes simplex virus 1. *Virology* 150(1):207-20.
2. Anderson, R.A.; Gompels, U.A. (1999). N- and C-terminal external domains of human herpesvirus-6 glycoprotein H affect a fusion-associated conformation mediated by glycoprotein L binding the N terminus. *J Gen Virol.* 80(Pt 6):1485-94.
3. Anderson, R.A.; Liu, D.X.; Gompels, U.A. (1996). Definition of a human herpesvirus-6 betaherpesvirus-specific domain in glycoprotein gH that governs interaction with glycoprotein gL: substitution of human cytomegalovirus glycoproteins permits group-specific complex formation. *Virology* 217(2):517-26.
4. Arsenakis, M.; Campadelli-Fiume, G.; Roizman, B. (1988). Regulation of glycoprotein D synthesis: does alpha 4, the major regulatory protein of herpes simplex virus 1, regulate late genes both positively and negatively? *J Virol.* 62(1):148-58.
5. Beadle, J.R.; Hartline, C.; Aldern, K.A.; Rodriguez, N.; Harden, E.; Kern, E.R.; Hostetler, K.Y. (2002). Alkoxyalkyl esters of cidofovir and cyclic cidofovir exhibit multiple-log enhancement of antiviral activity against cytomegalovirus and herpesvirus replication in vitro. *Antimicrob Agents and Chemother.* 46(8):2381-6.
6. Baines, J.D.; Roizman, B. (1993). The UL10 gene of herpes simplex virus 1 encodes a novel viral glycoprotein, gM, which is present in the virion and in the plasma membrane of infected cells. *J Virol.* 67(3):1441-52.
7. Batterson, W.; Roizman, B. (1983). Characterization of the herpes simplex virion-associated factor responsible for the induction of alpha genes. *J Virol.* 46(2):371-7.
8. Becker, Y.; Asher, Y.; Weinberg-Zahlering, E.; Rabkin, S.; Friedmann, A.; Kessler, E. (1978). Defective herpes simplex virus DNA: circular and circular-linear molecules resembling rolling circles. *J Gen Virol.* 40(2):319-35.
9. Becker, Y.; Dym, H.; Sarov, I. (1968). Herpes simplex virus DNA. *Virology* 36(2):184-92.
10. Bishop, G. A.; Marlin, S. D.; Schwartz, S. A.; Glorioso, J. C. (1984). Human natural killer cell recognition of herpes simplex virus type 1 glycoproteins: specificity analysis with the use of monoclonal antibodies and antigenic variants. *J Immunol.* 133(4):2206-14.

11. Braun, R.; Kirchner, H. (1986). Klinische Bedeutung von Infektionen mit Herpes-simplex-Viren. *Dt Ärzteblatt* 37:2433-38.
12. Braun, R.; Kirchner, H.; Munk, K.; Schröder, C. H. (1987). Herpes-simplex-Virus. *Kohlhammer Stuttgart, Berlin, Köln, Mainz*.
13. Braun, R.; Kühn, J. (1986). Immunmodulation durch Herpes-Simplex- und Zytomegalievirus. *Umschau* 12:632-36.
14. Browne, H.; Bell, S.; Minson, T.; Wilson, D.W. (1996). An endoplasmic reticulum-retained herpes simplex virus glycoprotein H is absent from secreted virions: evidence for reenvelopment during egress. *J Virol.* 70(7):4311-6.
15. Browne, H.M.; Bruun, B.C.; Minson, A.C. (1996). Characterization of herpes simplex virus type 1 recombinants with mutations in the cytoplasmic tail of glycoprotein H. *J Gen Virol.* 77(Pt 10):2569-73.
16. Browne, H.; Bruun, B.; Minson, T. (2001). Plasma membrane requirements for cell fusion induced by herpes simplex virus type 1 glycoproteins gB, gD, gH and gL. *J Gen Virol.* 82(Pt 6):1419-22.
17. Buckmaster, E.A.; Gompels, U.; Minson, A. (1984). Characterization and physical mapping of an HSV-1 glycoprotein of approximately 115×10^3 molecular weight. *Virology* 139(2):408-13.
18. Cairns, T.M.; Landsburg, D.J.; Whitbeck, J.C.; Eisenberg, R.J.; Cohen, G.H. (2005). Contribution of cysteine residues to the structure and function of herpes simplex virus gH/gL. *Virology* 332(2):550-62.
19. Campadelli-Fiume, G.; Poletti, L.; Dall'Olio, F.; Serafini-Cessi, F. (1982). Infectivity and glycoprotein processing of herpes simplex virus type 1 grown in a ricinresistant cell line deficient in *N*-acetylglucosaminyl transferase I. *J Virol.* 43(3):1061-71.
20. Chalfie, M. (1995). Green fluorescent protein. *Photochem Photobiol.* 62(4):651-6.
21. Chalfie, M.; Tu, Y.; Euskirchen, G.; Ward, W.W.; Prasher, D.C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263(5148):802-5.
22. Chang, Y.; Cesarman, E.; Pessin, M.S.; Lee, F.; Culpepper, J.; Knowles, D.M.; Moore, P.S. (1994). Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 266(5192):1865-9.
23. Cocchi, F.; Menotti, L.; Dubreuil, P.; Lopez, M.; Campadelli-Fiume, G. (2000). Cell-to-cell spread of wild-type herpes simplex virus type 1, but not of syncytial strains, is mediated by the immunoglobulin-like receptors that mediate

virion entry, nectin1 (PRR1/HveC/HlgR) and nectin 2 (PRR2/HveB). *J Virol.* 74(8):3909-17.

24. Cody, C.W.; Prasher, D.C.; Westler, W.M.; Prendergast, F.G.; Ward, W.W. (1993). Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the Aequorea green-fluorescent protein. *Biochemistry* 32(5):1212-8.

25. Corey, L.; Adams, H.G.; Brown, Z.A.; Holmes, K.K. (1983). Genital herpes simplex virus infections: clinical manifestations, course and complications. *Ann Intern Med.* 98(6):958-72.

26. Cormack B.P.; Valdivia, R.H.; Falkow S. (1996): FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene.* 173(1 Spec No):33-8.

27. Cubitt, A.B.; Heim, R.; Adams, S.R.; Boyd, A.E.; Gross, L.A.; Tsien, R.Y. (1995). Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci.* 20(11):448-55.

28. Darlington, R.W.; Moos, L.H. (1969). III. The envelope of herpesvirus. *Prog Med Virol.* 11:16-45.

29. Davis-Poynter, N.; Bell, S.; Minson, T.; Browne, H. (1994). Analysis of the contributions of herpes simplex virus type 1 membrane proteins to the induction of cell-cell fusion. *J Virol.* 68(11):7586-90.

30. Dean, H.J.; Cheung, A.K. (1993). A 3' coterminal gene cluster in pseudorabies virus contains herpes simplex virus UL1, UL2, and UL3 gene homologs and a unique UL3.5 open reading frame. *J Virol.* 67(10):5955-61.

31. DeFreitas, E.C.; Dietzschold, B.; Koprowski, H. (1985). Human T-lymphocyte response in vitro to synthetic peptides of herpes simplex virus glycoprotein D. *Proc Natl Acad Sci. USA* 82(10):3425-9.

32. De Clercq, E.; Descamps, J.; De Somer, P.; Barr, P.J.; Jones, A.S.; Walker, R.T. (1979). (E)-5-(2-Bromovinyl)-2'-deoxyuridine: a potent and selective anti-herpes agent. *Proc Natl Acad Sci USA.* 76(6):2947-51.

33. De Clercq, E. (2001).Molecular targets for antiviral agents: *J Pharmacol Exp Ther.* 297(1):1-10.

34. Desai, P.J.; Schaffer, P.A.; Minson, A.C. (1988). Excretion of non-infectious virus particles lacking glycoprotein H by a temperature-sensitive mutant of herpes simplex virus type 1: evidence that gH is essential for virion infectivity. *J Gen Virol.* 69(Pt 6):1147-56.

35. Desai, P.; Person, S. (1998). Incorporation of the green fluorescent protein into the herpes simplex virus type 1 capsid. *J Virol.* 72(9):7563-8.

36. Doerr, H. W.; Braun, R.; Munk, K. (1985). Human cytomegalovirus infection: recent developments in diagnosis and epidemiology. *Klin Wochenschr.* 63(6):241-51.
37. Doerr, H. W.; Holtz, T.; Fraunhoffer, M.; Braun, R. (1985). Immunologische Diagnostik der Zytomegalievirus (CMV)-Infektion. *Lab Med.* 9: 28-35.
38. Dubin, G.; Jiang, H. (1995). Expression of herpes simplex virus type 1 glycoprotein L (gL) in transfected mammalian cells: evidence that gL is not independently anchored to cell membranes. *J Virol.* 69(7): 4564-8.
39. Dunn, J.J.; Studier, F.W.; (1983). Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and the locations of the T7 genetic elements. *J Mol Biol.* 166(4):477-535.
40. Eggers, H.J. (1994). Menschenpathogene Viren. Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie, Brandis, H.; Köhler, W. (ed), pp 695-748, *Gustav Fischer Verlag Stuttgart, Jena, New York.*
41. Elliott, G.; O'Hare, P. (1999) Live-cell analysis of a green fluorescent protein-tagged herpes simplex virus infection. *J Virol.* 73(5): 4110-9.
42. Epstein, M. A.; Barr, Y. M. (1964). Cultivation in vitro of human lymphoblasts from Burkitt's malignant lymphoma. *Lancet.* 1(7327):252-3.
43. Foà-Tomasi, L.; Avitabile, E.; Boscaro, A.; Brandimarti, R.; Gualandri, R.; Manservigi, R.; Dall'Olio, F.; Serafini-Cessi, F.; Fiume, G.C.. (1991). Herpes simplex virus (HSV) glycoprotein H is partially processed in a cell line that expresses the glycoprotein and fully processed in cells infected with deletion or ts mutants in the known HSV glycoproteins. *Virology* 180(2):474-82.
44. Fletcher, T.M., Gray, W.L. (1993). DNA sequence and genetic organization of the unique short (US) region of the simian varicella virus genome. *Virology* 193(2):762-73.
45. Foster, T.P.; Chouljenko, V.N.; Kousoulas, K.G. (1999). Functional characterization of the HveA homolog specified by African green monkey kidney cells with a herpes simplex virus expressing the green fluorescence protein. *Virology* 258(2):365-74.
46. Foster T.P.; Rybachuk G.V.; Kousoulas K.G. (1998) Expression of the enhanced green fluorescent protein by herpes simplex virus type 1 (HSV-1) as an in vitro or in vivo marker for virus entry and replication. *J Virol Methods.* 75(2):151-60.
47. Forrester, A.; Farrell, H.; Wilkinson, G.; Kaye, J., Davis-Poynter, N.; Minson, T. (1992). Construction and properties of a mutant herpes simplex virus type 1 with glycoprotein H coding sequences deleted. *J Virol.* 66(1):341-8.

48. Frame, M.C.; Marsden, H.S.; McGeoch, D.J. (1986). Novel herpes simplex virus type 1 glycoproteins identified by antiserum against a synthetic oligopeptide from the predicted product of gene US4. *J Gen Virol.* 67(Pt 4):745-51.
49. Frenkel, N.; Schirmer, E.C.; Wyatt, L.S.; Katsafanas, G.; Roffman, E.; Danovich, R.M.; June, C.H. (1990). Isolation of a new herpesvirus from human CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87(2):748-52.
50. Friedman, H.M.; Cohen, G.H.; Eisenberg, R.J.; Seidel, C.A.; Cines, D.B. (1984). Glycoprotein C of herpes simplex virus 1 acts as a receptor for the C3b complement component on infected cells. *Nature* 309(5969):633-5.
51. Friedman, H.M.; Wang, L.; Fishman, N.O.; Lambris, J.D.; Eisenberg, R.J.; Cohen, G.C.; Lubinski, J. (1996). Immune evasion properties of herpes simplex virus type 1 glycoprotein C. *J Virol.* 70(7): 4253-60.
52. Fuller, A.O.; Lee, W.C. (1992). Herpes simplex virus type 1 entry through a cascade of virus-cell interactions requires different roles of gD and gH in penetration. *J Virol.* 66(8):5002-12.
53. Geraghty, R.J.; Krummenacher, C.; Cohen, G.H.; Eisenberg, R.J.; Spear, P.G. (1998). Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor. *Science.* 280(5369):1618-20.
54. Gerster, T.; Roeder, R.G. (1988). A herpesvirus trans-activating protein interacts with transcription factor OTF-1 and other cellular proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85(17):6347-51.
55. Gianni, T.; Fato, R.; Bergamini, C.; Lenaz, G.; Campadelli-Fiume, G. (2006). Hydrophobic alpha-helices 1 and 2 of herpes simplex virus gH interact with lipids, and their mimetic peptides enhance virus infection and fusion. *J Virol.* 80(16):8190-8.
56. Gianni, T.; Forghieri, C.; Campadelli-Fiume, G. (2006). The herpesvirus glycoproteins B and H.L are sequentially recruited to the receptor-bound gD to effect membrane fusion at virus entry. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103(39):14572-7.
57. Gianni, T.; Martelli, P.L.; Casadio, R.; Campadelli-Fiume, G. (2005). The ectodomain of herpes simplex virus glycoprotein H contains a membrane alpha-helix with attributes of internal fusion peptide, positionally conserved in the herpesviridae family. *J Virol.* 79(5):2931-40.
58. Gianni, T.; Menotti, L.; Campadelli-Fiume, G. (2005). A heptad repeat in herpes simplex virus 1 gH, located downstream of the alpha-helix with attributes of a fusion peptide, is critical for virus entry and fusion. *J Virol.* 79(11):7042-9.

59. Gianni, T.; Piccoli, A.; Bertucci, C.; Campadelli-Fiume, G. (2006). Heptad repeat 2 in herpes simplex virus 1 gH interacts with heptad repeat 1 and is critical for virus entry and fusion. *J Virol.* 80(5):2216-24.
60. Glorioso, J.; Schröder, C.H.; Kumel, G.; Szczesiul, M.; Levine, M. (1984). Immunogenicity of herpes simplex virus glycoproteins gC and gB and their role in protective immunity. *J Virol.* 50(3):805-12.
61. Gompels, U.; Minson, A. (1986). The properties and sequence of glycoprotein H of herpes simplex virus type 1. *Virology* 153(2):230-47.
62. Gompels, U.A.; Minson, A.C. (1989). Antigenic properties and cellular localization of herpes simplex virus glycoprotein H synthesized in a mammalian cell expression system. *J Virol.* 63(11):4744-55.
63. Gompels, U.A.; Carss, A.L.; Saxby, C.; Hancock, D.C.; Forrester, A.; Minson, A.C. (1991). Characterization and sequence analyses of antibody-selected antigenic variants of herpes simplex virus show a conformationally complex epitope on glycoprotein H. *J Virol.* 65(5):2393-401.
64. Harrison, S. (1985). Virus structure. *Virology*, pp 27-44. Fields, B. N.; Knipe, D. M.; Chanock, R. N.; Melnick, J. L.; Roizman, B.; Shope, R. E. (eds). *Raven Press, New York*.
65. Heim, R.; Tsien, R.Y. (1996). Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr Biol.* 6(2):178-82.
66. Heine, J.; Honess, R.; Cassai, E.; Roizman, B. (1974). Proteins specified by herpes simplex virus. XII. The virion polypeptides of type 1 strains. *J Virol.* 14(3): 640-51.
67. Herold, B.C.; Visalli, R.J.; Susmarski, N.; Brandt, C.R.; Spear, P.G. (1994). Glycoprotein C-independent binding of herpes simplex virus to cells requires cell surface heparan sulphate and glycoprotein B. *J Gen Virol.* 75(Pt 6):1211-22.
68. Honess, R.W.; Roizman, B. (1974). Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *J Virol.* 14(1):8-19.
69. Hope, R.G.; Palfreyman, J.; Suh, M.; Marsden, H.S. (1982). Sulphated glycoproteins induced by herpes simplex virus. *J Gen Virol.* 58(Pt 2):399-415.
70. Hutchinson, L.; Browne, H.; Wargent, V.; Davis-Poynter, N.; Primorac, S.; Goldsmith, K.; Minson, A.C.; Johnson, D.C. (1992). A novel herpes simplex virus glycoprotein, gL, forms a complex with glycoprotein H (gH) and affects normal folding and surface expression of gH. *J Virol.* 66(4):2240-50.

71. Jackson, M.R.; Nilsson, T.; Peterson, P.A. (1990). Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 9(10):3153-62.
72. Jackson, M.R.; Nilsson, T.; Peterson, P.A. (1993). Retrieval of transmembrane proteins to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* 121(2):317-33.
73. Jacob, R.J.; Morse, L.S.; Roizman, B. (1979). Anatomy of herpes simplex virus DNA. XII. Accumulation of head-to-tail concatemers in nuclei of infected cells and their role in the generation of the four isomeric arrangements of viral DNA. *J Virol.* 29(2):448-57.
74. Jöns, A.; Mettenleiter, T.C. (1997). Green fluorescent protein expressed by recombinant pseudorabies virus as an in vivo marker for viral replication. *J Virol Methods.* 66(2):283-92.
75. Johnson, D.C.; Feenstra, V. (1987). Identification of a novel herpes simplex virus type 1-induced glycoprotein which complexes with gE and binds immunoglobulin. *J Virol.* 61(7):2208-16.
76. Johnson, D.C.; Spear, P.G. (1982). Monensin inhibits the processing of herpes simplex virus glycoproteins, their transport to the cell surface, and the egress of virions from infected cells. *J Virol.* 43(3):1102-12.
77. Johnson, D.C.; Spear, P.G. (1983). O-linked oligosaccharides are acquired by herpes simplex virus glycoproteins in the Golgi apparatus. *Cell.* 32(3):987-97.
78. Klein, R. J. (1976). Pathogenetic mechanisms of recurrent herpes simplex virus infections. *Arch Virol.* 51(1-2):1-13.
79. Klupp, B.G.; Baumeister, J.; Karger, A.; Visser, N.; Mettenleiter, T.C. (1994). Identification and characterization of a novel structural glycoprotein in pseudorabies virus, gL. *J Virol.* 68(6):3868-78.
80. Klupp, B.G.; Mettenleiter, T.C. (1999). Glycoprotein gL-independent infectivity of pseudorabies virus is mediated by a gD-gH fusion protein. *J Virol.* 73(4):3014-22.
81. Kristensson, K.; Lycke, E.; Røyttä, M.; Svennerholm, B.; Vahlne, A. (1986). Neuritic transport of herpes simplex virus in rat sensory neurons in vitro. Effects of substances interacting with microtubular function and axonal flow [nocodazole, taxol and erythro-9-3-(2-hydroxynonyl)adenine]. *J Gen Virol.* 67(Pt 9):2023-8.
82. Kühn, J.E.; Kramer, M.D.; Willenbacher, W.; Wieland, U.; Lorentzen, E.U.; Braun, R.W. (1990). Identification of herpes simplex virus type 1 glycoproteins interacting with the cell surface. *J Virol.* 64(6):2491-7.

83. Lawrence, G.L.; Chee, M.; Craxton, M.A.; Gompels, U.A.; Honess, R.W.; Barrell, B.G. (1990). Human herpesvirus 6 is closely related to human cytomegalovirus. *J Virol.* 64(1):287-99.
84. Liu, D.X.; Gompels, U.A.; Foa-Tomasi, L.; Campadelli-Fiume, G. (1993). Human herpesvirus-6 glycoprotein H and L homologs are components of the gp100 complex and the gH external domain is the target for neutralizing monoclonal antibodies. *Virology* 197(1):12-22.
85. Liu, D.X.; Gompels, U.A.; Nicholas, J.; Lelliott, C. (1993). Identification and expression of the human herpesvirus 6 glycoprotein H and interaction with an accessory 40K glycoprotein. *J Virol. Gen* 74(Pt 9):1847-57.
86. Longnecker, R.; Roizman, B. (1986). Generation of an inverting herpes simplex virus 1 mutant lacking the L-S junction sequences, an origin of DNA synthesis, and several genes including those specifying glycoprotein E and the alpha 47 gene. *J Virol.* 58(2):583-91.
87. Lorentzen, E.U.; Eing, B.R.; Hafezi, W.; Manservigi, R.; Kühn, J.E. (2001). Replication-competent herpes simplex virus type 1 mutant expressing an auto-fluorescent glycoprotein H fusion protein. *Intervirology* 44(4):232-42.
88. Matthews, R. E. F. (1982). The classification and nomenclature of viruses, 4th report of the ICTV. *Intervirology* 17:1-199.
89. Matthews, J.T.; Cohen, G.H.; Eisenberg, R.J. (1983). Synthesis and processing of glycoprotein D of herpes simplex virus types 1 and 2 in an in vitro system. *J Virol.* 48(2):521-33.
90. Mettenleiter, T.C. (2002). Herpesvirus assembly and egress. *J Virol.* 76(4):1537-47.
91. Moore P.S.; Chang, Y. (1995). Detection of herpesvirus-like DNA sequences in Kaposi's sarcoma in patients with and without HIV infection. *N Engl J Med.* 332(18):1181-5.
92. Nahmias, A.J.; Alford, C.A.; Korones, S.B. (1970). Infection of the newborn with herpesvirus hominis. *Adv Pediatr.* 17:185-226.
93. Nahmias, A. J.; Roizman, B. (1973). Infection with herpes simplex viruses 1 and 2. *N Engl J Med.* 289, p. 667-74, 719-25, 781-9.
94. Nilsen, A.E.; Aasen, T.; Halsos, A.M.; Kinge, B.R.; Tjøtta, E.A.; Wikström, K.; Fiddian, A.P. (1982). Efficacy of oral acyclovir in the treatment of initial and recurrent genital herpes. *Lancet* 2(8298):571-3.

95. Novotny, M.J.; Parish, M.L.; Spear, P.G. (1996). Variability of herpes simplex virus 1 gL and anti-gL antibodies that inhibit cell fusion but not viral infectivity. *Virology* 221(1):1-13.
96. Prasher, D.G.; Eckenrode, V.K.; Ward, W.W.; Prendergast, F.G.; Cormier, M.J. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*. 111(2): 229-33.
97. Peng, T.; Ponce-de-Leon, M.; Jiang, H.; Dubin, G.; Lubinski, J.M.; Eisenberg, R.J.; Cohen, G.H. (1998). The gH-gL complex of herpes simplex virus (HSV) stimulates neutralizing antibody and protects mice against HSV type 1 challenge. *J Virol*. 72(1):65-72.
98. Peng, T.; Ponce-de-Leon, M.; Novotny, M.J.; Jiang, H.; Lambris, J.D.; Dubin, G.; Spear, P.G.; Cohen, G.H.; Eisenberg, R.J. (1998). Structural and antigenic analysis of a truncated form of the herpes simplex virus glycoprotein gH-gL complex. *J Virol*. 72(7):6092-103.
99. Pereira, L.; Wolff, M.H.; Fenwick, M.; Roizman, B. (1977). Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. V. Properties of alpha polypeptides made in HSV-1 and HSV-2 infected cells. *Virology*. 77(2):733-49.
100. Perry, C.M.; Wagstaff, A.J. (1995). Famciclovir. A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in herpesvirus infections. *Drugs*. 50(2):396-415.
101. Post, L.E.; Roizman, B. (1981). A generalized technique for deletion of specific genes in large genomes: alpha gene 22 of herpes simplex virus 1 is not essential for growth. *Cell*. 25(1):227-32.
102. Rajcáni, J.; Vojvodová, A. (1998). The role of herpes simplex virus glycoproteins in the virus replication cycle. *Acta Virol*. 42(2):103-18.
103. Rolan, P. (1995). Pharmacokinetics of new antiherpetic agents. *Clin Pharmacokinet*. 29(5):333-40.
104. Roizman, B. (1969). The herpesviruses - a biochemical definition of the group. *Curr Top Microbiol Immunol*. 49:3-79.
105. Roizman, B. (1979). The structure and isomerization of herpes simplex virus genomes. *Cell*. 16(3):481-94.
106. Roizman, B. (1982). The family herpesviridae: general description, taxonomy and classification. In: *The Herpesviruses* (B. Roizman, ed.), Vol.1, p.1. Plenum Press, New York, London.

107. Roizman, B.; Norrild, B.; Chan, C.; Pereira, L. (1984). Identification and preliminary mapping with monoclonal antibodies of a herpes simplex virus 2 glycoprotein lacking a known type 1 counterpart. *Virology* 133(1): 242-7.
108. Roizman, B.; Sears, A. (1996). Herpes simplex viruses and their replication. In: B. N. Fields, D. M. Knipe and P. M. Howley (eds.), *Virology Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia*, p. 2231-95.
109. Roop, C.; Hutchinson, L.; Johnson, D. (1993). A mutant herpes simplex virus type 1 unable to express glycoprotein L cannot enter cells, and its particles lack glycoprotein H. *J Virol.* 67(4):2285-97.
110. Rowe, W.P.; Hartley, J.W.; Waterman, S.; Turner, H.C.; Huebner, R.J. (1956). Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. *Proc Soc Exp Biol Med.* 92(2):418-24.
111. Ruyechan, W.T.; Morse, L.S.; Knipe, D.M.; Roizman, B. (1979). Molecular genetics of herpes simplex virus. II. Mapping of the major viral glycoproteins and of the genetic loci specifying the social behavior of infected cells. *J Virol.* 29(2):677-97.
112. Schneeweis, K. (1962). Serologische Untersuchungen zur Typdifferenzierung des Herpesvirus hominis. *Z. Immunforschung.* 124:24-29.
113. Schneeweis, K. (1986). Die Herpes-simplex-Virusinfektion. In: Klinische Virologie, S. 236-254. Gsell, O.; Krech, U.; Mohr, W. (Hrsg.), *Urban und Schwarzenberg München, Wien, Baltimore*.
114. Sheldrick, P.; Berthelot, N. (1975). Inverted repetitions in the chromosome of herpes simplex virus. *Cold Spring Harb Symp Quan. Biol.* 39(Pt 2):667-78.
115. Shukla, D.; Liu, J.; Blaiklock, P.; Shworak, N.W.; Bai, X.; Esko, J.D.; Cohen, G.H.; Eisenberg, R.J.; Rosenberg, R.D.; Spear, P.G. (1999). A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell.* 99(1):13-22.
116. Sivropoulou, A.; Arsenakis, M. (1993). Regulation of glycoprotein D synthesis of herpes simplex virus 1 by alpha 4 protein, the major regulatory protein of the virus, in stably transformed cell lines: effect of the relative gene copy numbers. *Arch Virol.* 131(1-2):153-68.
117. Skepper, J.N.; Whiteley, A.; Browne, H.; Minson, A. (2001). Herpes simplex virus nucleocapsids mature to progeny virions by an envelopment --> deenvelopment --> reenvelopment pathway. *J Virol.* 75(12):5697-702.
118. Sodeik, B. (2000). Mechanisms of viral transport in the cytoplasm. *Trends Microbiol.* 8(10):465-72.

119. Spear, P.G. (1985). Glycoproteins specified by herpes simplex viruses. In: The herpesviruses, pp. 315-356, Roizman, B. (ed). *Plenum Press, New York*.
120. Stackpole, C.W. (1969). Herpes-type virus of the frog renal adenocarcinoma. I. Virus development in tumor transplants maintained at low temperature. *J Virol.* 4(1):75-93.
121. Stearns, T. (1995). Green fluorescent protein. The green revolution. *Curr Biol.* 5(3):262-4.
122. Turner, A.; Bruun, B.; Minson, T.; Browne, H. (1998). Glycoproteins gB, gD, and gHgL of herpes simplex virus type 1 are necessary and sufficient to mediate membrane fusion in a Cos cell transfection system. *J Virol.* 72(1):873-5.
123. Wagstaff, A.J.; Faulds, D.; Goa, K.L. (1994). Aciclovir. A reappraisal of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. *Drugs.* 47(1):153-205.
124. Warner, M.S.; Geraghty, R.J.; Martinez, W.M.; Montgomery, R.J.; Whitbeck, J.C.; Xu, R.; Eisenberg, R.J.; Cohen, G.H.; Spear, P.G. (1998). A cell surface protein with herpesvirus entry activity (HveB) confers susceptibility to infection by mutants of herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2, and pseudorabies virus. *Virology.* 246(1):179-89.
125. Weir, J.P. (2001). Regulation of herpes simplex virus gene expression. *Gene.* 271(2):117-30.
126. Weller, T. H.; Coons, A. H. (1954). Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med.* 86(4):789-94.
127. Westra, D.F.; Glazenburg, K.L.; Harmsen, M.C., Tiran, A.; Scheffer, A.J.; Welling G.W.; Hauw The, T.; Welling-Wester, S. (1997). Glycoprotein H of herpes simplex virus type 1 requires glycoprotein L for transport to the surfaces of insect cells. *J Virol.* 71(3):2285-91.
128. Westra, D.F.; Kuiperij, H.B.; Welling, G.W.; Scheffer, A.J.; The, T.H.; Welling-Wester, S. (1999). Domains of glycoprotein H of herpes simplex virus type 1 involved in complex formation with glycoprotein L. *Virology* 261(1):96-105.
129. Westra, D.F.; Verjans, G.M.; Osterhaus, A.D.; van Kooij, A.; Welling, G.W.; Scheffer, A.J.; The, T.H.; Welling-Wester, S. (2000). Natural infection with herpes simplex virus type 1 (HSV-1) induces humoral and T cell responses to the HSV-1 glycoprotein H:L complex. *J Gen Virol.* 81(Pt 8):2011-5.

130. Whiteley, A.; Bruun, B.; Minson, T.; Browne, H. (1999). Effects of targeting herpes simplex virus type 1 gD to the endoplasmic reticulum and trans-Golgi network. *J Virol.* 73(11): 9515-20.
131. Whitely, R.J. (1996). Herpes simplex viruses. In: Fields Virology pp 2297-2342, Fields, B.N.; Knipe, D.M.; Howley, P.M. (ed) *Lippincott Raven, Philadelphia, New York.*
132. Wilson, D.W.; Davis-Poynter, N.; Minson, A.C. (1994). Mutations in the cytoplasmic tail of herpes simplex virus glycoprotein H suppress cell fusion by a syncytial strain. *J Virol.* 68(11):6985-93.
133. WuDunn, D.; Spear, P.G. (1989). Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. *J. Virol.* 63(1):52-8.
134. Wolff, M. H. (1986). Herpes simplex-Virus-Infektionen. *Diagn. Lab* 36:104-111.
135. Zezulak, K.M.; Spear, P.G (1983). Characterization of a herpes simplex virus type 2 75,000-molecular-weight glycoprotein antigenically related to herpes simplex virus type 1 glycoprotein C. *J Virol.* 47(3):553-62.
136. Zolotukhin, S.; Potter, M.; Hauswirth, W.W.; Guy, J.; Muzyczka, N. (1996). A "humanized" green fluorescent protein cDNA adapted for high-level expression in mammalian cells. *J Virol.* 70(7):4646-54.

Herrn Universitätsprofessor Dr. med. J. E. Kühn gilt mein Dank für die Unterstützung, wissenschaftliche Hilfestellung und Hilfsbereitschaft in allen Phasen der Arbeit.

Bei der Arbeitsgruppe der Klinischen Virologie, Fr. Dr. E. Lorentzen, Hr. Dr. B. Eing und Hr. Dr. Wali Hafezi möchte ich mich für stete Diskussionsbereitschaft und hilfreiche Ratschläge in technischen Fragen bedanken.

Den Mitarbeitern der Abteilung für klinische Virologie, besonders Frau Maria Hovens danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Meiner Grossmutter, Eltern und Freunden möchte ich ebenfalls für Ihre Unterstützung danken, ohne welche diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

