

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Institut für Medizinische Mikrobiologie
Klinische Virologie

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

**Fluoreszenzmikroskopische Analyse des intrazellulären Verteilungsmusters
von Kapsid-, Tegument- und Hüllglykoproteinen des
Herpes simplex-Virus Typ 1**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Stefanie Wehmeier

aus Herford

2006

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

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. med. H. Jürgens
1. Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. med. J. E. Kühn
2. Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. rer. nat. H. Karch

Tag der mündlichen Prüfung: 25.09.2006

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: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. H. Karch

Zusammenfassung

Fluoreszenzmikroskopische Analyse des intrazellulären Verteilungsmusters von Kapsid-, Tegument- und Hüllglykoproteinen des Herpes simplex-Virus Typ 1

Wehmeier, Stefanie

Ziel dieser Dissertation war es, das intrazelluläre Verteilungsmuster von HSV-1-Proteinen in intakten, unfixierten Säugerzellen zu analysieren und somit Rückschlüsse auf den intrazellulären Transport von Nachkommenviren und subviraler Bestandteile sowie die Funktion viraler Strukturproteine zu erzielen.

Im Mittelpunkt des Interesses standen das Kapsidprotein UL35, die Tegumentproteine US9 und US11 sowie die Hüllglykoproteine gE und gL. Der Transfer der Virusproteinsequenzen erfolgte mit dem Vektor pBacMam2gDproEGFP, der eine hocheffiziente, HSV-spezifische Genexpression unter Kontrolle des HSV-1-gD-Promotors ermöglicht und die Expression viraler Fusionsproteine mit EGFP als Expressionsmarker erlaubt. Weitere Fusionsproteine wurden mit den Autofluoreszenzproteinen EYFP, ECFP und DsRed konstruiert. Nach separater sowie simultaner Expression der Fusionsproteine in Säugerzellen wurde das Verteilungsmuster fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Die Virusproteine zeigten entsprechend ihrer Eigenschaft als Kapsid-, Tegument- oder Hüllglykoprotein typische intrazelluläre Verteilungsmuster, die mit Literaturdaten übereinstimmten und aus denen Rückschlüsse auf ihre Funktion innerhalb des replikativen Zyklus gezogen werden konnten. Durch Koexpression von zwei oder drei verschiedenfarbig autofluoreszierenden Virusproteinen in einer Zelle gelang es erstmals, simultan das intrazelluläre Verteilungsmuster von viralen Hüll-, Tegument- und Kapsidbestandteilen in intakten Zellen zu beobachten.

Tag der mündlichen Prüfung: 25.09.2006

Meinem Doktorvater, Herrn Univ.-Prof. Dr. med. J. E. Kühn, möchte ich an dieser Stelle ganz besonders danken für die Überlassung des Themas, die Möglichkeit in der Virologie arbeiten zu können und insbesondere für die sehr gute fachliche und menschliche Betreuung, die wissenschaftliche Hilfestellung und stete Diskussionsbereitschaft.

Ich danke weiter der gesamten Arbeitsgruppe der Klinischen Virologie – Dr. E. Lorentzen, Dr. B. Eing, Dr. W. Hafezi und Dr. A. Heid – für die tolle Unterstützung und freundliche Betreuung.

Ein besonderes Dankeschön auch an M. Hovens.

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Herpesviridae.....	1
1.2 Humanpathogene Herpesviren	3
1.3 Herpes simplex-Viren.....	5
1.3.1 Aufbau des Virions, virale Proteine	7
1.3.2 Genom des Herpes simplex-Virus Typ 1	8
1.3.3 Replikativer Zyklus, Regulationskaskade der viralen Genexpression	9
1.4 Biochemie und Transport der Proteine des Herpes simplex-Virus Typ 1	12
1.4.1 Kapsidprotein UL35	12
1.4.2 Tegumentprotein US9.....	12
1.4.3 Tegumentprotein US11.....	14
1.4.4 Glykoprotein L	15
1.4.5 Glykoprotein E	16
1.5 Fluoreszenzproteine.....	17
1.6 Aufgabenstellung.....	19
2. Material	21
2.1 Viren	21
2.2 Zelllinien.....	21
2.3 Medien und Medienzusätze für die Zellkultur	21
2.4 Bakterienstämme	21
2.5 Medien für die Bakterienkultur	22
2.6 Nukleinsäuren.....	22
2.7 Molekulargewichtstandards.....	23
2.8 Antikörper.....	23
2.9 Enzyme	23
2.10 Chemikalien/Reagenzien	23
2.11 Reagentsysteme	24
2.12 Puffer, Lösungen und Gelzusammensetzung	24
2.13 Geräte	25
2.14 Laborbedarf	26
2.15 Filmmaterial	27
3. Methoden.....	28
3.1 Molekularbiologische Methoden.....	28
3.1.1 Polymerasekettenreaktion.....	28

3.1.2 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	29
3.1.3 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	29
3.1.4 Ligation von DNA-Fragmenten	30
3.1.5 Transformation von Bakterien.....	30
3.1.6 Präparation von Plasmid-DNA	30
3.1.7 DNA-Agarosegelelektrophorese und Fragmentelution	31
3.2 Virusstock-Präparation	32
3.3 Zellkulturtechniken.....	32
3.3.1 Zellkultur	32
3.3.2 Transfektion von Zellen	33
3.3.3 Infektion der Zellen mit HSV-1.....	33
3.3.4 Plaque-Assay zur Bestimmung des HSV-1-Titers	34
3.4 Techniken zur Proteindetektion.....	34
3.4.1 Lyse der Zellen	34
3.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	35
3.4.3 Western-Blot.....	35
3.4.4 Fluoreszenzmikroskopie.....	36
4. Ergebnisse	38
4.1 PCR-Amplifikation.....	38
4.1.1 UL35.....	38
4.1.2 US9 und US11	39
4.1.3 US8	40
4.2 Insertion der PCR-Amplifikate in Klonierungsvektoren.....	41
4.3 Klonierung der Virusproteinsequenzen in fluoreszenzmarkertragenden Transfervektoren.....	42
4.3.1 Transfervektor pBacMam2gDproEGFP.....	42
4.3.2 Konstruktion von pBacMam2gDproEYFP, pBacMam2gDproECFP und pBacMam2gDproDsRed1	42
4.3.3 Klonierung der Fusionsproteine UL35EGFP und UL35ECFP	43
4.3.3.1 pBacMam2gDproUL35EGFP	43
4.3.3.2 pBacMam2gDproUL35ECFP	44
4.3.4 Markierung der Tegumentproteinsequenzen US9 und US11 mit EYFP.....	46
4.3.4.1 pBacMam2gDproUS9EYFP und pBacMam2gDproUS11EYFP.....	47
4.3.5 Klonierung der Hüllproteine gL und gE in Expressionsvektoren	48
4.3.5.1 Herstellung von pBacMam2gDprogLDsRed1	48
4.3.5.2 Klonierung von pBacMam2gDprogHspEGFPgE	50
4.4 Charakterisierung der autofluoreszierenden Proteine mit Fluoreszenz- mikroskopie und Western-Blot.....	52
4.4.1 Expressionsvektoren.....	53
4.4.2 Kapsidprotein UL35EGFP und UL35ECFP	53
4.4.3 Tegumentproteine US9EYFP und US11EYFP	54
4.4.4 Glykoproteine gLDsRed und gHspEGFPgE.....	55
4.4.5 Simultane Expression von Virusproteinen	58

5. Diskussion.....	60
5.1 Expression und Verteilungsmuster des Kapsidproteins UL35	62
5.2 Expression und Verteilung des Fluoreszenzmusters von US9	63
5.3 Expression und Verteilungsmuster des Tegumentproteins US11	65
5.4 Expression und Verteilung des Fluoreszenzmusters von gL.....	67
5.5 Expression und Verteilung des Fluoreszenzmusters von gE.....	68
5.6 Die simultane Expression von verschiedenen autofluoreszierenden Virus- proteinen	70
6. Zusammenfassung	72
7. Literaturverzeichnis	74
8. Lebenslauf	88

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schematische Darstellung des Herpes simplex-Virus Typ 1.....	7
Abb. 2	Genomaufbau des HSV-1 und die Isomere des Genoms.....	9
Abb. 3	Position und Orientierung von UL35, US9, US11 und US8 innerhalb des HSV-1-Stammes 17syn+.....	38
Abb. 4	Analytische Agarosegelelektrophorese des PCR-Amplifikates UL35 nach 10 Zyklen und 20 Zyklen.....	39
Abb. 5	Analytisches Gel des PCR-Ansatzes von US9 und US11.....	41
Abb. 6	gE-DNA im analytischen Gel nach PCR im Vergleich mit kb-ladder.....	41
Abb. 7	Klonierung von pBacMam2gDproDsRed1.....	43
Abb. 8	pBacMam2gDproUL35EGFP-Verdau mit BglII und NcoI.....	44
Abb. 9	pBacMam2gDproUL35ECFP-Verdau mit NcoI und NotI.....	44
Abb. 10	Konstruktion des Vektors pBacMam2gDproUL35EGFP.....	45
Abb. 11	Klonierung von pBacMam2gDproUL35ECFP.....	45
Abb. 12	Schema zur Konstruktion von pBacMam2gDproEYFP.....	46
Abb. 13	Klonierungsschema der rekombinanten Plasmide pBacMam2gDproUS9EYFP und pBacMam2gDproUS11EYFP.....	47
Abb. 14	Schema der Konstruktion von pBacMam2gDprogLDsRed1.....	49
Abb. 15	Analytisches Gel des Verdau des Vektors pBacMam2gDprogLDsRed1 mit BglII und NotI.....	49
Abb. 16	Herstellung von pBacMam2gDprogHspEGFP2.....	50
Abb. 17	Konstruktion des Expressionsvektors pBacMam2gDprogHspEGFPgE.....	51
Abb. 18	Nachweis der Expression von EGFP, EYFP, UL35EGFP und UL35ECFP per Western-Blot.....	53
Abb. 19	Expression der Fusionsproteine UL35EGFP und UL35ECFP in Kulturzellen.....	54
Abb. 20	Intrazelluläres Verteilungsmuster von US9EYFP und US11EYFP.....	54

Abb. 21 Nachweis der zellulären Expression von US9EYFP und US11EYFP im Western-Blot.....	55
Abb. 22 Transiente Expression des Fusionsprotein gLDsRed und Nachweis von DsRed und gLDsRed im Western-Blot.....	56
Abb. 23 Markierung des Golgi-Apparates mit ECFP, der Aktinfilamente mit EYFP und Expression von gLDsRed in HeLa-Zellen.....	56
Abb. 24 Fluoreszenzmikroskopische Analyse des gE-Verteilungsmusters und Nachweis des gE-EGFP-Proteins im Western-Blot.....	57
Abb. 25 Co-Expression von UL35ECFP, US11EYFP und gLDsRed in einer Zelle....	58

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Auflistung humanpathogener Herpesviren.....3

Tab. 2 Übersicht der Fluoreszenzproteine und ihrer Exzitations- und Emissions-
maxima.....19

Tab. 3 Primerpaare und PCR-Bedingungen für die Amplifikationen von UL35,
US9, US11 und gE.....28

Tab. 4 Fluoreszenzmikroskopfilter mit den jeweiligen Exzitations- und Emissions-
maxima.....36

Tab. 5 *forward*(fw)- und *backward*(bw)-Primer zur Amplifikation der UL35-
Sequenz.....39

Tab. 6 Sequenzen der Primerpaare zur Amplifikation von US9 und US11.....40

Tab. 7 Primerpaare zur Amplifikation der US8(gE)-Sequenz.....40

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
aqua bidest.	zweimal destilliertes Wasser
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CMV	Cytomegalievirus
CO ₂	Kohlendioxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate/Oligonukleotidmix
DsRed	<i>Discosoma striatum</i> -Rot
EBV	Ebstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EYFP	<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>
ECFP	<i>enhanced cyan fluorescent protein</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
et al.	und Mitarbeiter
EtBr	Ethidiumbromid
FCS	fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung, Gramm
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunden
HHV	Humanes Herpesvirus
HIPK	<i>homeodomain-interacting protein kinase</i>
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus

Abkürzungsverzeichnis

HSV	Herpes simplex-Virus
HTLV	Humanes T-Zell-lymphotrophes-Virus
ICP	<i>infected cell protein</i>
IgG	Immunglobulin G
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria Broth (Nährmedium)
M	molar
MEM	minimum essential medium
mg	Milligramm
ml	Milliliter
min	Minute
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
nm	Nanometer
ng	Nanogramm
ori	<i>origin of replication</i>
ORF	<i>open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
p.f.u.	<i>plaque forming units</i>
PKR	Proteinkinase R
PRR-1	poliovirus receptor-related protein-1
PRV	Pseudorabiesvirus
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rotation per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat

Abkürzungsverzeichnis

sec	Sekunde
syn	Synzytien-bildend
Tab.	Tabelle
Taq	DNA-Polymerase von <i>Thermus aquaticus</i>
TGN	trans Golgi-Netzwerk
U	Unit (Einheit)
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
VHS(-Protein)	virus-host-shutoff(-protein)
VP	Virusprotein
VZV	Varizella-Zoster-Virus
wt	wild-type
w/v	Masse/Volumen
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

1. Einleitung

Humane Herpesviren wie das Herpes simplex-Virus Typ 1 sind Auslöser verschiedenster infektiöser Erkrankungen. Der fein abgestimmte und kaskadenartig ablaufende Infektionszyklus, beginnend bei der Virusadsorption bis hin zur Bildung von Nachkommenviren, wird durch die Interaktion zahlreicher viraler und zellulärer Proteine geprägt. Die intrazelluläre Lokalisation einzelner Virusproteine lässt Rückschlüsse auf ihre Funktion zu und ermöglicht so den Ablauf der viralen Infektion zu analysieren und mögliche Ansatzpunkte für Therapien zu erschliessen.

In den folgenden Abschnitten werden zunächst die bislang gesicherten Informationen zur Molekularbiologie der Herpesviren, speziell des Herpes simplex-Virus Typ 1, und der in dieser Arbeit im Mittelpunkt stehenden viralen Proteine vorgestellt.

1.1 Herpesviridae

Die Herpesviren sind mit mehr als 100 bekannten Vertretern in der Natur weit verbreitet und können mit einer hohen Wirtsspezifität beim Menschen wie auch bei vielen Tierarten zu den unterschiedlichsten Erkrankungen führen. Die Zugehörigkeit der Viren zu dieser Familie beruht auf ähnlichen morphologischen und biologischen Eigenschaften.

Die Herpesviren besitzen als reife umhüllte Partikel eine variable Größe zwischen 120 und 300nm und bestehen aus folgenden strukturellen Komponenten: Kern, Kapsid, Tegument und Hülle. Der 70nm große Kern (core) bildet die innerste Struktur des Partikels und beinhaltet das Genom, das als doppelsträngiges lineares DNA-Molekül vorliegt und mit einer Proteinmatrix assoziiert ist (63). Innerhalb der Herpesviren findet man Genomgrößen von 120-230kbp (13). Das Kapsid umgibt als Proteinhülle mit einem ikosaedrischen Aufbau den Kern. Es besteht aus 162 Kapsomeren und hat einen Durchmesser von 88-110nm. Eine amorphe, proteinhaltige Matrix, das Tegument, verbindet das Nukleokapsid mit der Virushülle (envelope). Diese Lipidmembran bildet die äußerste Struktur des reifen Viruspartikels und trägt eine Vielzahl von Glykoproteinen, die elektronenmikroskopisch als zahlreiche nach außen gerichtete Spikes imponieren (121).

Das wichtigste gemeinsame biologische Merkmal der Herpesviren ist ihre Fähigkeit, nach der einmal erfolgten Primärinfektion latent im Organismus zu verbleiben und aus dem unterschiedlich langen Stadium der Latenz wieder in den lytischen Infektionszyklus einzutreten (140). Diese Reaktivierung wird durch verschiedene Faktoren wie z.B. Immunsuppression, physikalische Reize oder Stress ausgelöst. Die Folge sind rekurrende Infektionen. Eine weitere übereinstimmende Eigenschaft der Vertreter dieser Familie ist das Zerstören der Wirtszellen bei der Produktion von Nachkommen-viren.

Die Herpesviridae werden in 3 Subfamilien unterteilt und zwar in die α -, β - und γ -Herpesviridae (121, 141). Die Einteilung erfolgt nach Kriterien wie Zelltropismus oder Wachstumsverhalten. Charakteristisch für die α -Herpesviridae ist ein kurzer Vermehrungszyklus. Sie weisen das breiteste Wirtszellspektrum für in vitro kultivierte Zellen auf und erzeugen einen ausgeprägten zytopathogenen Effekt. In vivo persistieren diese Vertreter in den Nervenzellen der Ganglien. Dagegen besitzen die β -Herpesviren einen längeren Replikationszyklus und einen relativ engen Wirtsbereich in vivo und in vitro. Der zytopathogene Effekt ist geringer ausgeprägt. Kennzeichnend für die γ -Herpesviren ist ein noch weiter eingegrenzt Wirtsspektrum. Sie infizieren Zellen, die bereits hochgradig differenziert sind, v.a. lymphoblastoide Zellen und nur selten Epithel- oder Fibroblastenzellen. Die replikativen Zyklen dauern bei den einzelnen Mitgliedern dieser Subfamilie unterschiedlich lang.

Einige typische Vertreter der drei Subfamilien sind in der Tab. 1 aufgelistet.

Humanpathogene Herpesviren	Subfamilie	Genomgrösse (kbp)	Virusassoziierte Erkrankungen
Herpes simplex-Virus Typ 1	α	152	Herpes labialis, Temporallappenzephalitis, Keratitis
Herpes simplex-Virus Typ 2	α	152	Herpes genitalis, Herpes neonatorum
Varizella-Zoster-Virus	α	125	Windpocken, Herpes zoster
Epstein-Barr-Virus	γ	172	Mononukleose, Burkitt-Lymphom, Nasopharyngealkarzinom
Zytomegalievirus	β	229	generalisierte Infekte bei Neugeborenen und immunsupprimierten Personen
Humanes Herpesvirus 6 Typ A Typ B	β	162	? Exanthema subitum
Humanes Herpesvirus 7	β	145	vermutlich Exanthema subitum
Humanes Herpesvirus 8	γ	ca. 230	Kaposi-Sarkom

Tab. 1 Auflistung humanpathogener Herpesviren, deren Zugehörigkeit zu den jeweiligen Subfamilien und den assoziierten Erkrankungen.

1.2 Humanpathogene Herpesviren

Bislang sind 9 Herpesviren beschrieben worden, deren natürlicher Wirt der Mensch ist (Tab.1). Die ausgelösten Erkrankungen manifestieren sich in unterschiedlichen Organen, wie z.B. im Bereich der Haut, des zentralen Nervensystems oder des lymphatischen Systems. Neben den klinisch inapparenten Infektionen erstreckt sich das

breite Spektrum der symptomatischen Verläufe von lokal begrenzten Effloreszenzen bis zu generalisierten, schwer verlaufenden Erkrankungen. Des Weiteren werden einige der Herpesviren mit Tumorerkrankungen in Verbindung gebracht. Die humanpathogenen Herpesviren weisen insgesamt einen hohen Durchseuchungsgrad auf, wobei der erste Kontakt mit den Viren häufig schon im Kindes- und Jugendalter erfolgt.

Die Neurotropie, die Etablierung der latenten Infektion in sensorischen Ganglienzellen, und die Replikation im epithelialen Gewebe stellen Gemeinsamkeiten der Herpes simplex-Viren und des Varizella-Zoster-Virus dar. Das zu den α -*Herpesviridae* gehörende Varizella-Zoster-Virus (154) weist neben der ausgeprägten Kontagiosität einen hohen Manifestationsindex auf und verursacht bei der primären Infektion die Windpocken. Diese präsentieren sich klinisch als generalisiertes vesikuläres Exanthem, welches einer schubweisen Entwicklung unterliegt und somit aufgrund der verschiedenen Vesikelstadien als polymorphes Bild („Sternenhimmel“) imponiert. Der wahrscheinlich auf dem Boden einer nachlassenden zellulären Immunantwort gegen VZV entstehende Rezidivinfekt bietet eine andere Erscheinungsform, den Herpes zoster (Gürtelrose), und äußert sich in gruppenförmig angeordneten Bläschen, die sich in der Regel begrenzt auf ein oder mehrere Dermatome einer Körperhälfte ausbreiten.

Die Infektion mit dem humanen Cytomegalievirus führt zur Bildung von Riesenzellen sowie viralen Einschlusskörperchen (Eulenaugenzellen) und bleibt primär zu >90% symptomlos, selten kommt es zu einem mononukleoseähnlichen Krankheitsbild (76). Das Cytomegalievirus persistiert in den Zellen des blutbildenden Systems. Klinisch von Bedeutung sind diaplazentare Übertragungen auf das Ungeborene bei Primärinfektion seronegativer Mütter, die gerade zum Zeitpunkt einer frühen Schwangerschaft letal enden können oder schwerwiegende Folgeschäden, wie z.B. psychomotorische Retardierung, Hörverlust oder epileptische Anfälle verursachen. Ebenso sind besonders Immunsupprimierte, sei es im Rahmen einer Transplantation, AIDS- oder Malignom-erkrankung, durch klinisch schwer und nicht selten letal verlaufende CMV-Infektionen in Form von interstitiellen Pneumonien, Enzephalitis, Chorioretinitis oder Colitis, gefährdet. Auch Entzündungen oder Abstoßungen des Organtransplantates können die Folge sein.

Die sich sehr ähnlichen HHV-6 und HHV-7 werden ebenso wie CMV den β -*Herpesviridae* zugeordnet und infizieren hauptsächlich T-Zellen. Vom HHV-6 existieren die 2 unterschiedlichen Typen A und B, wobei Typ B als Erreger des Exanthema subitum identifiziert worden ist (1, 130). Gewöhnlich erkranken Kinder bereits in dem Alter von 6 Monaten bis Ende des 2. Lebensjahres und leiden ca. 3 Tage unter einem hohen Fieber, mit anschließender Entfieberung erscheint am ganzen Körper ein Exanthem. Das HHV-7 konnte ebenfalls aus Patienten isoliert werden, die an Exanthema subitum erkrankt waren (3, 62). Weitere klinische Manifestationen konnten bislang weder dem HHV-6 Typ A noch HHV-7 zugeordnet werden.

Das Epstein-Barr-Virus aus der Subfamilie der γ -*Herpesviridae* besitzt als Zielzellen u.a. die B-Lymphozyten sowie naso- und oropharyngealen Epithelzellen. Infektionen verlaufen im Kleinkindesalter meist asymptomatisch, beim Jugendlichen oder Erwachsenen kommt es häufiger zu der infektiösen Mononukleose mit generalisierten Lymphknotenschwellungen, Splenomegalie, fieberhafter Tonsillitis oder auch Hepatitis (93). Außerdem ist das EBV an der Genese endemisch vorkommender Tumorerkrankungen, dem Burkitt-Lymphom in Äquatorialafrika (42) und dem Nasopharynxkarzinom in Südostasien (73), beteiligt.

Eine onkogene Potenz wird auch dem HHV-8 zugesprochen, welches in den Zellen des Kaposi-Sarkoms gefunden wurde (108).

Neben den 9 humanpathogenen Viren kann das Herpesvirus simiae (SHV-1), ein Herpesvirus der Rhesusaffen, bei Kontakten, z.B. mit Speichel oder nach Bissen, ZNS-Infektionen des Menschen mit hoher Letalität verursachen (12).

1.3 Herpes simplex-Viren

Infektionen mit den weltweit verbreiteten Herpes simplex-Viren gehören zu den häufigsten Virusinfektionen des Menschen. Die Infektionen im Bereich der Haut und Schleimhäute induzieren gruppenförmig zusammenliegende Bläschen, die sich typischerweise kriechend ausbreiten und daher den Begriff Herpes (von griechisch herpein = kriechen) prägten, der bereits im Altertum zur Beschreibung bläschenbildender Hauterkrankungen herangezogen wurde. Im Jahr 1919 gelang durch Löwenstein erstmalig die Virusisolation (89), 1962 erbrachten Nahmias und Schneeweis

den Nachweis für das Vorliegen von 2 Subtypen (HSV-1 und HSV-2), die sich durch ihre antigenen Eigenschaften voneinander unterscheiden (131). Der Mensch ist für beide Herpes simplex-Virustypen das einzige natürliche Erregerreservoir und überträgt die Viren während symptomatischer oder asymptomatischer Rezidive über Tröpfchen- oder Kontaktinfektionen. Die Erreger finden über Läsionen der Haut oder Schleimhäute den Eintritt in den menschlichen Körper, replizieren sich lytisch in den infizierten Zellen, gelangen in die das Gewebe versorgenden freien Nervenendigungen und dann über einen retrograden axonalen Transport in die sensorischen Ganglienzellen, in welchen sie eine lebenslang persistierende latente Infektion etablieren. Latentes Virus bildet das Reservoir für endogene Rezidivinfekte, die durch verschiedenste Faktoren wie Fieber, psychische Belastung oder UV-Licht reaktiviert werden können.

HSV-1 wird zumeist über Tröpfcheninfektion bereits im Säuglings- oder Kleinkindalter übertragen und erreicht bis zum Erwachsenenalter eine Durchseuchungsrate von über 95%. Als Ausdruck der Primärinfektion entsteht in seltenen Fällen eine Gingivostomatitis aphthosa, überwiegend verläuft die Infektion klinisch stumm oder führt zu leichten Beschwerden. Die Infektion mit dem HSV-2 erfolgt überwiegend sexuell, nimmt häufiger einen symptomatischen Verlauf und manifestiert sich klinisch in der Regel als Herpes genitalis. Die Seroprävalenz von HSV-2 beträgt bei Erwachsenen 10 bis 30%. Überwiegend sind HSV-1-Infektionen oral, HSV-2-Infektionen dagegen genital lokalisiert. Allerdings werden auch in Abhängigkeit von der Eintrittspforte zunehmend HSV-1-Infektionen im Genitalbereich sowie orale HSV-2-Infektionen beobachtet.

In Einzelfällen kann es bei supprimiertem bzw. unreifem Immunsystem durch Virämie zu einer schweren generalisierten Infektion kommen. So können sich Neugeborene unter der Geburt im Falle einer vaginalen Herpesinfektion (apparent oder inapparent) der Mutter mit dem HSV-2 infizieren und an einer Herpessepsis (Herpes neonatorum) mit Fieber, generalisierten Bläschen und Enzephalitis erkranken. Diese Komplikation verläuft unbehandelt zu ca. 50% letal und hinterlässt bei Überlebenden häufig Residualsymptome. Weitere Beispiele schwerer Komplikationen sind eine Temporalappenenzephalitis und das Eczema herpeticum.

Hinsichtlich der Therapie von Infektionen mit ausgeprägten Symptomen und Komplikationen ist das Nucleosidanalogon Aciclovir Mittel der ersten Wahl und kann

systemisch sowie auch lokal appliziert werden. Das Virostatikum wird bei der Replikation von der viralen Thymidinkinase als Substrat akzeptiert und phosphoryliert. Der Einbau in die virale DNA führt zum Strangabbruch. Zusätzlich wirkt das Medikament über die Hemmung der viralen DNA-Polymerase.

1.3.1 Aufbau des Virions, virale Proteine

Die reifen Herpes simplex-Viren besitzen einen variablen Durchmesser von 120-280nm und bestehen aus Polypeptiden, die je nach Zeitpunkt ihrer Bildung während des replikativen Zyklus in α -, β - und γ -Proteine eingeteilt werden. Ebenso existiert eine Einteilung der viralen Proteine in Struktur- und Nichtstrukturproteine. Diese Nichtstrukturproteine wie z.B. die DNA-Polymerase, die virale Thymidinkinase oder das ori_{Lyt}-bindende Protein sind essentiell für die Replikation des HSV-Genoms, da sie als Katalysatoren enzymatischer Reaktionen fungieren. Die Strukturproteine sind Komponenten des Grundgerüsts der Herpes simplex-Viren, dem Kapsid, Tegument und der Lipidhülle. Von den mehr als 30 Strukturproteinen konnten bereits einige mit wichtigen Funktionen näher charakterisiert werden.

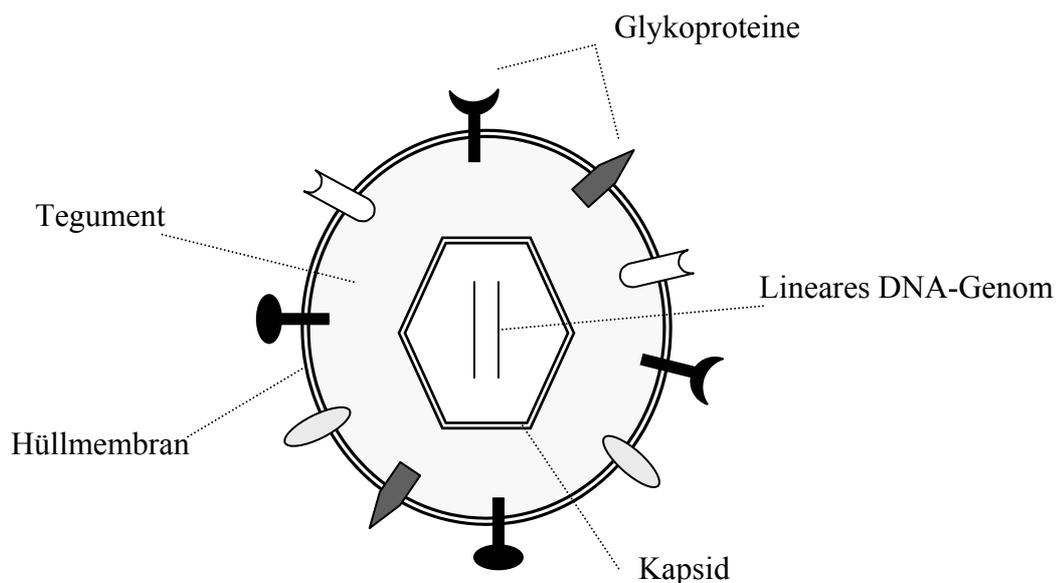


Abb. 1 Schematische Darstellung des Herpes simplex-Virus Typ 1.

Im Bereich der Virushüllmembran gibt es eingelagerte Glykoproteine, von denen derzeit 11 bekannt sind. Die nach außen gerichteten Glykoproteine ermöglichen die Kontaktaufnahme und das Eindringen in die Wirtszelle. Ebenso sorgen sie auch für eine effiziente Virusumhüllung und den intrazellulären Transport von Virionen. Das Spektrum ihrer Funktionen erstreckt sich auch auf den Schutz des Virions gegenüber der Immunreaktion des Wirtes, indem Komplement oder der Fc-Teil von Immunglobulin G gebunden wird.

Unter den Tegumentproteinen befinden sich das virale Protein 16 (VP16) und das virus-host-shutoff-protein (VHS) mit wichtigen Funktionen. Das VP16 (α -TIF-Protein) ist das Produkt des Leserahmens UL48 und verstärkt die Expression der immediate early-Gene im Kern der infizierten Zelle. Das VHS-Protein spielt über die Hemmung der Proteinsynthese der Wirtszelle eine Rolle bei der Initiation der viralen Replikation.

Die Kapsidstruktur wird hauptsächlich von dem Virusprotein 5 gebildet. Jeweils 6 Moleküle des VP5 konstruieren ein Capsomer, von diesen wiederum formieren 162 das Kapsid. Zwischen den Capsomeren befinden sich weitere Proteine mit wichtigen Funktionen. So spannt das VP23 ein fibrilläres Netzwerk zwischen den Capsomeren und das VP19C dient möglicherweise der Verankerung der DNA im Kapsidinneren (16).

1.3.2 Genom des Herpes simplex-Virus Typ 1

Das HSV 1-Genom liegt mit einer Länge von 152kbp und einem Molekulargewicht von ungefähr 100×10^6 Dalton in linearer, doppelsträngiger Form im Viruskern vor. Der vollständig bekannte DNA-Code mit offenen Leserastern für über 70 Polypeptide lässt sich in ein langes und ein kurzes Segment unterteilen (94, 95). Diese Subregionen wiederum bestehen aus einer einmalig vorkommenden Sequenz (*unique*), die jeweils an beiden Enden von invertierten repetitiven Elementen (a, b und c) flankiert wird (120, 151). Somit existieren Wiederholungseinheiten an den Genomenden (terminal repeats) und als Verknüpfungselement dienende repetitive Sequenzen zwischen den beiden Subregionen (internal repeats). Die Wiederholungssequenzen begünstigen Rekombinationsvorgänge, durch die während der Replikation 4 isomere Genomformen entstehen, in denen die U_L - und U_S -Regionen zueinander unterschiedliche Orientierung

besitzen (132, Abb. 2). Die Genomformen liegen zu gleichen Prozentzahlen in den Virionen vor und tragen den gleichen Informationsgehalt. Alle Isomere sind infektiös und replikationsfähig.

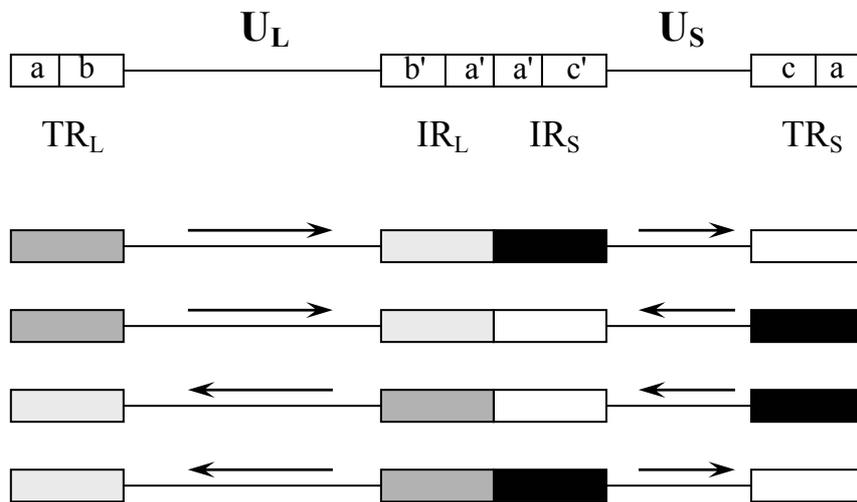


Abb. 2 Genomaufbau des HSV-1 und die Isomere des Genoms. Die Orientierung der homologen DNA-Sequenzen wird durch die Pfeilrichtung angegeben. U_L und U_S bezeichnen die einmalig vorkommenden Sequenzen. TR und IR stehen für repetitive Genomregionen.

1.3.3 Replikativer Zyklus, Regulationskaskade der viralen Genexpression

Die kaskadenartig regulierte Expression des viralen Genoms läuft im Nukleoplasma der Wirtszelle ab und ist von zellulären Strukturen abhängig. Initial steht die Adsorption der infektiösen Partikel an die Wirtszelloberfläche mit der nachfolgenden Penetration in das Zytoplasma im Vordergrund. Glykoproteine übernehmen bei diesen Vorgängen entscheidende Funktionen. Nachdem gB und gC eine reversible Bindung an Heparansulfatmoleküle der Zelloberfläche vermitteln (74, 88, 160), können andere virale Glykoproteine über eine Interaktion mit den Zelloberflächenrezeptoren die irreversible Fusion der viralen und wirtseigenen Hüllmembran einleiten. Beteiligt sind an diesem Prozess des Zelleintritts neben gD der Heterokomplex aus gH und gL sowie auf zellulärer Seite Rezeptorproteine, die als HveM (Herpesvirus entry mediator) bezeichnet

werden (24, 27, 126, 137). Von den derzeit 3 bekannten Hve-Mediatoren stammen HveB (Nectin-2, PRR 2) und HveC (Nectin-1, PRR 1) aus der Immunglobulin-Superfamilie (34, 65). HveA dagegen konnte als Mitglied der Tumornekrosfaktor-Alpha-Rezeptorfamilie identifiziert werden (103, 156). Daneben kann auch D-Glucosaminyl-3-O-Sulfotransferase 3-modifiziertes Heparansulfat als spezifischer Rezeptor fungieren (133). Nach Verschmelzung der beiden Membranen gelangt nun das Nukleokapsid mit dem Tegument in das Wirtszellzytoplasma und das Nukleokapsid wird unter Beteiligung des zellulären Zytoskeletts zu den Kernporen transportiert (136). Ebenso sind die über Kerntransportsignale verfügbaren viralen Proteine in der Lage, das Nukleoplasma zu erreichen. Beispielsweise besitzt das Tegumentprotein VP16 diese Eigenschaft und leitet nach Komplexbildung mit dem zellulären DNA-bindenden Protein Oct-1 durch Induktion der α -Gentranskription die virale Genexpression ein (66). Zeitgleich sorgt ein weiteres Tegumentprotein, das VHS, für die Unterbrechung der zellulären Proteinsynthese (59). Die α -Gene sind die am frühesten im Replikationszyklus exprimierten Gene, deren Produkte sind die α - oder auch immediate early-Proteine ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 und ICP47 (ICP = infected cell proteins). Das Expressionsmaximum liegt bei 2-4 Stunden post infectionem. Sie regulieren die Transkription der β -Gene. Zu den β -Genprodukten (β -Proteine oder early-Proteine) zählen zum einen Enzyme wie z.B. die DNA-Polymerase und die virale Thymidin-kinase und zum anderen nucleinsäurebindende Polypeptide wie das Origin-bindende Protein (UL9) oder das single-stranded DNA-binding protein (SSB). Die β -Proteine werden überwiegend 5-7h nach Infektion exprimiert. In dem Zeitraum 12-18h nach Infektionsbeginn folgt die Expression der γ -Gene, die weiter in γ_1 ($\beta\gamma$)-Gene und γ_2 -Gene eingruppiert werden. Bei den Produkten der γ -Gene handelt es sich um Virusstrukturproteine, darunter befinden sich das Hauptkapsidprotein oder die Glykoproteine. Die Transkription der γ -Gene hängt mit Ausnahme der γ_1 -Untergruppe stark von der Virus-DNA-Replikation ab und unterliegt der Steuerung durch die Transaktivierung durch α -Proteine.

Die Vermehrung der viralen DNA wird durch Anlagerung des Origin-binding proteins an 3 Replikationsstartpunkten (ori_S1 , ori_S2 , ori_L) der HSV-DNA initiiert und erstreckt sich über einen Zeitraum von 10-20h. Der Replikationsvorgang vollzieht sich an der zuvor zirkularisierten Virus-DNA und folgt dem Prinzip eines „rolling-circle“-

Mechanismus (10, 78). Dieser Vorgang liefert als Produkt eine lange konkatemere angeordnete DNA-Sequenz mit vielfachen Kopien der Virus-DNA. Parallel findet die Expression der transkribierten γ -Gene im Zytoplasma statt. Nach anschließenden Modifikationen wird ein Teil dieser späten Virusproteine zur inneren Kernmembran transportiert. Im Zellkern werden unter Beteiligung verschiedener viraler Genprodukte die viralen Partikelvorläufer formiert. Durch das Schneiden der DNA-Konkatemere an spezifischen Signalsequenzen wird jeweils ein HSV-Genomäquivalent in das leere Capsid eingeschleust.

Das DNA-haltige Nucleocapsid wird nun vom Zellkern in den Extrazellulärraum transportiert. Für diesen Vorgang werden zwei verschiedene Modelle diskutiert. Gemeinsam ist beiden das Verlassen des Perinuklearraumes durch „budding“ der Kapside. Dabei stülpt sich die innere Zellkernmembran aus und bildet die Lipidhülle, in die bereits die nach der Translation zur Kernmembran transportierten Glycoproteine eingelagert sind. Diese viralen Glycoproteine entsprechen allerdings erst noch unreifen Vorstufen.

Der weitere Transport aus der Zelle erfolgt nach dem Johnson-Spear-Modell über endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Apparat per Vesikeltransport (79). Während des Transportes werden die in der Hüllmembran integrierten Glycoproteine im ER und Golgi-Komplex prozessiert, so dass die letztendlich reifen infektiösen Viren im Vesikel an die Zellmembran gelangen und durch Fusion der aus dem ER und Golgi-Komplex stammenden Membran mit der Zellmembran austreten kann. In diesem Fall würde die Virushülle aus der inneren Zellmembran bestehen.

Demgegenüber beschreibt Stackpole mit seinem Deenvelopment-reenvelopment-Modell (1969) die Verschmelzung der Lipidhülle des Nucleocapsids mit der äußeren Kernmembran. Dadurch werden nackte Nucleokapside im Zytoplasma freigesetzt. Glycoproteine werden posttranslationell unabhängig von Viruspartikeln über den Golgi-Apparat zur Zellmembran transportiert. Dabei können sich von den Golgi-Zisternen Membranen mit integrierten reifen Glykoproteinen abschnüren und als bilamellares Vesikel das nicht umhüllte Nucleokapsid umschließen. Die innere Lamelle entspricht somit der endgültigen Hülle des reifen HSV-Virus. Die äußere Membran fusioniert mit der Zellmembran und vollendet somit die Ausschleusung des infektiösen Viruspartikels in den Extrazellulärraum (138).

1.4 Biochemie und Transport der Proteine des Herpes simplex-Virus Typ 1

1.4.1 Kapsidprotein UL35

Die Genregion UL35 wird als $\gamma 2$ -Gen exprimiert und liefert ein kleines Polypeptid, das aus 112 Aminosäuren bestehende Virusprotein 26 mit einem ungefähren Molekulargewicht von 12kDa (14, 41, 97). Posttranslational wird VP26 durch Phosphorylierung an Serin- und Threoninresten modifiziert (98). Es ist als Strukturprotein in 900facher Kopie im Kapsid lokalisiert und ist das kleinste der 7 bekannten Kapsidproteine, die eine ikosaedrische Hülle um das HSV-1-Genom bilden. Das Hauptkapsidprotein VP5 bildet Hexamere und Pentamere, wobei VP26 nur auf den häufiger vorkommenden Hexameren zu finden ist und sich dort jeweils mit 6 Molekülen symmetrisch um jedes VP5-Hexamer verteilt. Die Konformationsunterschiede zwischen Hexameren und Pentameren müssen daher auch die VP26-Bindungsstellen betreffen (142, 145, 158, 161). Im VP26-Molekül ist die C-terminale Hälfte (Aminosäuren 50 bis 112) für die ATP-abhängige Kapsidinteraktion verantwortlich (45). Der Zeitpunkt der VP26-Rekrutierung während des Kapsidszusammenbaus ist nicht bekannt (33). VP26 scheint für die strukturelle Stabilisation des Kapsids nicht notwendig zu sein und hat wahrscheinlich eher funktionelle Signifikanz, indem es z.B. das Kapsid an das umgebende Tegument und die Hülle führt (14).

In HSV-1-infizierten Zellen ist VP26 v.a. im Nukleus zu finden. Diese Lokalisation wurde nur beobachtet, wenn VP5 entweder mit VP19C oder preVP22a gemeinsam vorhanden ist. (43, 117).

VP26 ist für das Viruswachstum in Zellkulturen nicht notwendig, scheint aber für die Produktion von infektiösen Viren in Ganglien von Mäusen wichtig zu sein (44).

1.4.2 Tegumentprotein US9

Der offene Leserahmen US9 des HSV-1-Genoms codiert für ein Tegumentprotein, das sich aus 90 Aminosäuren zusammensetzt und ein Molekulargewicht von ca. 10kDa besitzt (61). Die Funktion des Proteins ist insgesamt noch unklar. Es ist zum Zeitpunkt

der Nukleokapsidformation oder direkt danach im Nukleus der infizierten Zellen zu finden (61, 100).

Das lysinfreie US9-Protein wird in der Zelle mit dem zellulären Polypeptid Ubiquitin konjugiert und ist mit Proteasomen assoziiert. Die Konsequenz der Ubiquitinylierung ist noch unverstanden. Da das Protein infolge der Ubiquitinkonjugation nicht abgebaut wird, sondern für mehrere Stunden stabil ist, kann es den Abbau von spezifischen Proteinen verhindern (15).

Desweiteren gab es Versuche mit Mäusen, die zeigten, dass u.a. das US9-Protein keine wesentliche Funktion in der Neurovirulenz und Latenz einnimmt (106).

Im Gegensatz zu dem US9-Protein des HSV-1 zeigt das US9-Genprodukt im Pseudorabiesvirus eine Zuordnung zu den Hüllmembranproteinen. Als TypII-Membranprotein durchspannt es mit 26 AS die Lipiddoppelschicht, hat 3 AS am Carboxyterminus an der Viruspartikeloberfläche und erstreckt sich mit 68 AS ins Virusinnere, in die Tegumentschicht. Anders als beim HSV-1 ist das US9-Protein des PRV in dem sekretorischen Zellsystem, vornehmlich im Golgi-Apparat, lokalisiert (17). Diese Lokalisation ist Resultat eines dynamischen Prozesses, da US9 von der Plasmamembran endozytiert wird. Für diesen Vorgang sind innerhalb der zytoplasmatischen Domäne zwei Endozytosesignale erforderlich, eine Ansammlung von Säuren sowie ein Dilucininmotiv (18, 20, 21). In Versuchen mit Nervenzellen erwies sich das PRV US9-Protein als essentiell für die axonale Lokalisation von verschiedenen Virusmembranproteinen, nicht aber von Kapsid- oder Tegumentproteinen. Denkbar ist hier ein Transportmechanismus, der auf ein tyrosinbasiertes Sortiersignal im US9-Protein zurückgreift. Die neben dem US9-Protein in den Golgi-Vesikeln enthaltenen viralen Membranproteine werden so durch die Wechselwirkung des US9-Sortiersignals mit zytoplasmatischen Adapterproteinen, z.B. AP-3, zu den Axonen geleitet (19, 57, 143).

In einem β -Herpesvirus, dem Cytomegalievirus, übernimmt das US9-Protein eine wichtige Aufgabe in der Zell-zu-Zellausbreitung über laterale Membranen in polarisierten Zellen, ähnlich der Funktion des HSV-1-Glykoproteins E (92).

1.4.3 Tegumentprotein US11

Der offene Leserahmen von US11 trägt die Information für ein ungefähr 18kDa großes Protein bestehend aus 161 Aminosäuren. Das US11-Gen wird als $\gamma 2$ -Gen im Infektionszyklus exprimiert und gilt als nicht-essentiell für das Viruswachstum in vivo (4, 84, 91, 116). Das US11-Protein ist in 600-1.000facher Kopie im Tegument eines HSV-Virions vorhanden und wird durch zelluläre Kinasen an multiplen Serinresten phosphoryliert (47, 124, 134). Zum Zeitpunkt der frühen Infektion zeigt das US11-Protein eine nukleozytoplasmatische Lokalisation und akkumuliert später in den Nukleoli (46, 48, 114, 125).

Es ist ein regulatorisches RNA-Bindungsprotein mit Sequenz- und Konformationspezifität (122, 124). Die Aminosäuresequenzen zur RNA-Bindung und zu der Assoziation mit den Ribosomen und Nukleoli befinden sich am C-Terminus. Typische Signalsequenzen, die viele andere RNA-Bindungsproteine charakterisieren, erscheinen hier aber nicht. Auffällig ist dagegen an dem C-terminalen Ende ein sich wiederholendes Motiv aus den 3 Aminosäuren Arginin, X und Prolin, wobei X häufig einem sauren oder ungeladenen polaren Aminosäurerest entspricht. Die Anzahl der Wiederholungen variiert unter den einzelnen HSV-1 Stämmen. Die Präsenz von Prolinresten an jeder 3. Position lässt die Ausbildung einer Poly-L-Prolin II-Helix vermuten, die in der Bindung von RNA-Molekülen involviert ist (116, 122, 125, 129). Das US11-Protein bindet spezifisch an die 60S-Ribosomenuntereinheit, wobei die Bindungsstelle an der 28S oder 5.8S rRNA lokalisiert ist (125). Weitere Substrate der RNA-Bindungsdomäne sind zum einen die $\Delta 34$ -RNA, eine verkürzte Form der mRNA des ORF UL34 und die coterminalen RNAs der Sequenzen UL12, UL13 und UL14 (4, 123). Zusätzlich konnte die Möglichkeit der Bindung von 2 RNAs von Retroviren nachgewiesen werden, zum einen das HTLV-Typ 1 Rex response-element (XRE) und zum anderen das HIV-Typ 1 Rev response-Element (RRE), wodurch die Hüllglykoproteinexpression transaktiviert wird (4, 48, 129). Neuere Daten belegen auch eine Interaktion von US11 mit der PEST-Domäne von HIPK2, wodurch ein Schutz der Zelle gegenüber dem HIPK2-induzierten Zellwachstumsstopp resultiert (67).

Desweiteren nimmt das US11-Protein eine wesentliche Funktion in dem PKR-vermittelten Abbruch der Proteinsynthese ein. Die wirtseigene Proteinkinase R wird im

Rahmen einer Infektion aktiviert und phosphoryliert eIF-2 α , so dass es zum Abbruch der zellulären Proteinsynthese kommt. Die Aminosäuren 91 bis 121 inmitten der RNA-Bindungsdomäne von US11 und RNA-Moleküle sind für die Interaktion von US11 mit der PKR notwendig. Auf der Seite der PKR ist die N-terminale Domäne entscheidend (28, 29, 30, 86, 112). Ebenso kann US11 die PKR-Aktivierung durch PACT blockieren, einem zellulären Polypeptid, das die PKR in Abwesenheit von dsRNA aktivieren kann. Die Bindung von US11 an dem N-Terminus von PKR verhindert den Konformationswechsel nach der Interaktion mit der PACT-Domäne 3, die in der Aktivierung der PKR enden würde (104, 111).

Weitere bekannte Wechselwirkungen existieren zwischen US11 und der schweren Kinesinkette sowie PAT1. Die US11- μ KHC-Interaktion kann für eine Rolle von US11 im anterograden Transport von nichtumhüllten Nukleokapsiden in Axonen sprechen (49, 64). Die Assoziation mit dem zellulären PAT1-Polypeptid erhält möglicherweise eine wichtige Bedeutung im intrazellulären Transport von viralen Komponenten (11).

Zusätzlich wurde beobachtet, dass die US11-Proteinexpression den Zellen ein erhöhtes Überleben unter Hitzeschockbehandlung bietet (4, 87).

1.4.4 Glykoprotein L

Der Leserahmen UL1 des HSV-1-Genoms liefert die Information zur Synthese der Precursor-Form des gL mit 224 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 25-30kDa. Es besitzt eine Position zur N-glykosidischen Bindung von Zuckerresten. Auf dem Weg zur Zelloberfläche wird das Protein durch Addition von Zuckerresten zur reifen 40kDa-Form prozessiert. Eine hydrophobe Region mit einem Methioninrest am aminoterminalen Ende dient dabei als Signalpeptid und wird während der post-translationalen Modifikationen abgespalten (75).

Mit dem 110kDa-Glykoprotein H geht gL eine stabile Komplexbildung ein. Glykoprotein H besteht aus 838 Aminosäuren und besitzt hydrophobe Regionen im amino- sowie carboxyterminalen Bereich, die als Signalpeptid und Transmembrananker dienen (25, 68, 115). Da die reife Form von gL in Abwesenheit von gH ins Zellmedium sezerniert wird und außer der Signalpeptidsequenz keine weiteren hydrophoben Regionen als Transmembrandomäne aufweist, ergibt sich die Membranassoziation von

gL nur aus der Komplexbildung mit gH (55, 75). Demgegenüber ist gH hinsichtlich seiner korrekten Faltung und des intrazellulären Transportes auf gL angewiesen. Ohne gL exprimiertes gH wird im ER zurückgehalten (60, 75, 119, 155).

Der Heterokomplex aus gH und gL wird als funktionelle Einheit angesehen. Die gH/gL-negativen Virusmutanten sind in der Lage an Zellen zu adsorbieren, können diese aber nicht penetrieren und eine Infektion initiieren. Der Heterokomplex ist daher essentiell für das Eindringen von HSV-1-Viren in die Wirtszellen und für die virusinduzierte Zellfusion (23, 40, 71, 75, 126, 147).

1.4.5 Glykoprotein E

Das Phosphoglykoprotein E ist ein integrales Membranprotein, das sich aus 550 Aminosäuren zusammensetzt und innerhalb der unique short-Region (US8) des HSV-1-Genoms codiert wird. Die reife Form besitzt ein Molekulargewicht von 80kDa (8). gE wird früh im Reifungsprozess phosphoryliert und besitzt 2 Serinreste an Position 476 und 477 innerhalb der zytoplasmatischen Domäne, die von der zellulären Casein-Kinase II als Akzeptor für Phosphatgruppen erkannt werden (101). Die Anwesenheit von gE ist *in vitro* keine Voraussetzung für die virale Infektiosität. Virusmutanten, die gE nicht exprimierten, sind *in vitro* replikationskompetent (105).

Die Expression von gE auf der Virushülle bzw. auf der Oberfläche HSV-1-infizierter Zellen verleiht einen Schutz gegenüber der antikörpervermittelten Neutralisation durch die Immunabwehr des Wirtes. gE verfügt innerhalb der extrazellulären Domäne am Aminoterminus zwischen den Aminosäuren 235 bis 380 über eine immunglobulin-ähnliche Domäne und ist so in der Lage, IgG-Komplexe an die infizierten Zellen zu binden. Die Bindung von IgG-Monomeren wird erst über die stabile Komplexbildung über die Aminosäuren 235 bis 264 von gE mit dem Glykoprotein I möglich. Glykoprotein I ist ebenfalls ein phosphoryliertes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 70kDa und ist mit den Aminosäuren 128 bis 145 an der Bildung des HSV-1-Fc-Rezeptors beteiligt. Die Steigerung der Affinität des Fc-Rezeptors durch die Komplexbildung ist noch ungeklärt. Diskutiert werden Konformationsänderungen der Fc-Rezeptordomäne von gE durch die Komplexbildung mit gI oder die Entstehung einer

neuen Fc-Bindungsdomäne mit hoher Affinität zu IgG-Monomeren (6, 7, 53, 54, 80, 81, 118).

Der gE/gI-Komplex wird zum frühen Zeitpunkt der HSV-1-Infektion im TGN beobachtet. Die Lokalisation basiert auf 2 Sortiersignalen in der zytoplasmatischen gE-Domäne, einem Tyrosinmotiv innerhalb der ersten 28 AS und einem Tyrosinmotiv inmitten eines Abschnittes mit negativ geladenen Aminosäuren. Ein Dileucinmotiv im intrazellulären gI-Teil unterstützt möglicherweise die Effekte dieser Sortiersignale (2, 96).

Der als funktionelle Einheit angesehene Komplex aus gE und gI übernimmt eine wichtige Funktion im intrazellulären Transport von Virionen zur basolateralen Zelloberfläche und bei der Zell-zu-Zell-Ausbreitung, zumindest in polarisierten Zellen oder in Zellen mit stark ausgeprägten Zellverbindungen. In diesen Zellen findet man gE/gI in den späten Infektionsstadien an der lateralen Oberfläche. In hochgradig transformierten Zelllinien beeinflusst gE/gI dagegen nicht die Zell-zu-Zell-Ausbreitung. Dort wurde gE unabhängig von gI an der Zelloberfläche beobachtet. In polarisierten Zellen steuern die oben genannten Sortiersignale von gE und gI über die Interaktion mit der zellulären Sortiermaschinerie, z.B. über die Bindung an den AP-1-Clathrin-Adapter-Komplex, den Vesikeltransport der Virionen zu den Zellverbindungen und initiieren dort über die Bindung an zelluläre Liganden die Zell-zu-Zell-Ausbreitung (2, 36, 50, 51, 52, 82, 83, 96, 128, 159).

Desweiteren scheint gE zusammen mit gD essentiell für die zytoplasmatische Umhüllung von Nukleokapsiden zu sein (58).

1.5 Fluoreszenzproteine

Autofluoreszierende Proteine erwiesen sich in den letzten Jahren als wertvolle Marker in der Molekular- und Zellbiologie, um verschiedenste Prozesse zu visualisieren, wie z.B. die Genexpression oder Proteinlokalisierung. Derzeit ist das von der Tiefseequalle *Aequorea victoria* stammende Fluoreszenzprotein GFP (green fluorescent protein) am besten untersucht. Im Jahr 1992 gelang die Klonierung der cDNA von wt-GFP mit nachfolgender rasanter Beschleunigung der biochemischen Charakterisierung und molekularbiologischer Anwendung (77, 113). Auch in der Erforschung von Proteinen

des HSV-1 fand das GFP breite Verwendung und so konnten die zelluläre Verteilung der Virusproteine während des Infektionszyklus beobachtet und Rückschlüsse auf die Proteinfunktion gewonnen werden (31, 32, 38, 139, 146). Von Vorteil ist dabei die Eigenschaft des Fluoreszenzproteins, auf weitere exogene Substrate oder Cofaktoren nicht angewiesen zu sein. Ebenso kann auf eine Fixierung oder Lyse der Zielzellen verzichtet werden, so dass Prozesse in intakten, lebenden Zellen beobachtet werden können ohne wesentliche Beeinflussung der physiologischen Zellfunktionen (31, 85). Die GFP-cDNA codiert ein 238 AS-Polypeptid mit einem ungefähren Molekulargewicht von 27kDa. Das reife Protein ist sehr stabil, absorbiert Licht bei einem Maximum um 395nm und besitzt ein Emissionsmaximum um 508nm. Verantwortlich für die Lichtemission ist ein angeregtes Phenolatanion im Chromophor, die eine Imidazolringstruktur aufweist und posttranslational durch Cyclisierung des Tripeptids Ser65-Tyr66-Gly67 gebildet wird (35, 38, 107, 113).

Es wurden zahlreiche Mutationen in die AS-Sequenz eingeführt, um die Fluoreszenzeigenschaften zu optimieren. Etliche Basensubstitutionen in insgesamt 88 Codons der wt-GFP-Sequenz erzeugten eine Annäherung der Codonzusammensetzung an die menschlicher Gene (*open reading frames*) und damit eine verbesserte Expression der synthetischen Derivate in Säugetierzellen (70, 162). Andere gezielte Mutationen erzeugten GFP-Derivate mit verschobenen Emissionsmaxima. So führte ein Austausch von 2 AS (F64L, S65T) zur Konstruktion des EGFP (*enhanced green fluorescent protein*), das über eine intensivere Fluoreszenz (100fach höher) verfügt und ein Exzitationsmaximum von 488nm besitzt (37). ECFP und EYFP sind weitere GFP-Varianten. Das ECFP (*enhanced cyan fluorescent protein*) wurde durch 6 AS-Substitutionen abgeleitet und besitzt einen Emissionsgipfel im blauen Bereich des Lichtspektrums (475nm), das EYFP (*enhanced yellow fluorescent proteins*) erreicht durch Austausch von 4 AS ein Emissionsmaximum um 527nm (72, 102, 109).

Ein weiteres autofluoreszierendes Protein und entferntes GFP-Homolog wurde in der Koralle *Discosoma striatum* entdeckt. Das als DsRed bezeichnete 28kDa-Protein zeigt im Vergleich zu den GFP-Varianten eine noch weitere Verschiebung des Absorptions- und Emissionsmaximum in den langwelligen Bereich des Lichtspektrums (Tab. 2). Eine weitere abweichende Eigenschaft ist die Zusammenlagerung der Moleküle zu Tetrameren. Das Chromoprotein ist nur in oligomerer Form zur roten Autofluoreszenz

fähig. Die besondere Proteinmolekülanordnung sorgt für eine starke Fluoreszenzstabilität, aber im Vergleich zum EGFP auch für eine langsamere Fluoreszenzentwicklung. Vergleichbar mit GFP entsteht das Chromophor über Cyclisierung der AS-Reste Gln66 und Gly68 und nachfolgender Dehydrogenierung von Tyr67 (5, 127, 149, 150, 152).

Fluoreszenzprotein	Exzitations- maximum (nm)	Emissions- maximum (nm)	Farbe
<i>Aequorea victoria</i> GFP			
Varianten			
GFP	395 (470)	509	grün
EGFP	488	507	grün
EYFP	513	527	gelb-grün
ECFP	433 (453)	475 (501)	cyan
<i>Discosoma striatum</i> Protein			
DsRed	558	583	Rot

Tab. 2 Übersicht der Fluoreszenzproteine und ihrer Exzitations- und Emissionsmaxima.

1.6 Aufgabenstellung

Ziel der Arbeit war die Analyse des intrazellulären Verteilungsmusters von HSV-1-Kapsid-, Tegument- und Hüllproteinen in Säugerzellen. Zur Übertragung der genetischen Information von verschiedenen Virusproteinen wurde der von A. Heid in der Arbeitsgruppe modifizierte Transfer- und Expressionsvektor pBacMam2gDproEGFP gewählt, der eine hocheffiziente, HSV-spezifische Genexpression unter Kontrolle des HSV-1-gD-Promotors erlaubt und als Expressionsmarker EGFP besitzt. In diesen Vektor sollten jeweils die kodierenden Sequenzen der ausgewählten Virusproteine kloniert werden. Hierbei wurden die Hüllproteine gL und gE, die

Tegumentkomponenten US9 und US11 sowie das Kapsidprotein UL35 ausgewählt. Zur Markierung der Virusproteine diente das autofluoreszierende Molekül EGFP. Zusätzlich sollten Fusionskonstrukte mit andersfarbigen Fluoreszenzproteinen wie DsRed oder den GFP-Derivaten EYFP und ECFP hergestellt werden, um die simultane intrazelluläre Darstellung von viralen Proteinen zu ermöglichen.

Mit Hilfe dieses methodischen Ansatzes sollten Rückschlüsse auf den intrazellulären Transport von Nachkommenviren und subviraler Bestandteile sowie die Funktion viraler Strukturproteine ermöglicht werden.

2.5 Medien für die Bakterienkultur

LB-Agar	GibcoBRL, Eggenstein
LB-Broth-Base (Fertigmedium)	GibcoBRL, Eggenstein
S.O.C. Medium	GibcoBRL, Eggenstein

2.6 Nukleinsäuren

Vektoren:

pGEM [®] -T Easy	Promega, Mannheim
pCR [®] 2.1-TOPO	Invitrogen, USA
pECFP-1	Clontech, Heidelberg
pECFP-Golgi	Clontech, Heidelberg
pEYFP-1	Clontech, Heidelberg
pEYFP-Actin	Clontech, Heidelberg
pDsRed1-N1	Clontech, Heidelberg
pBacMam2gDproEGFP	Klinische Virologie, Münster
pDsRed1-N1-gL	Klinische Virologie, Münster

Nukleotide:

dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Boehringer Mannheim, Mannheim
------------------------	-------------------------------

Primer:

Die folgenden PCR-Primer wurden von der Firma Carl Roth, Karlsruhe geliefert:

UL35 Bgl: 5'GGC CAG ATC TAT GGC CGT CCC GCA ATT TCA CC 3'

UL35 Nco: 5'GCG CCC ATG GGG GTC CCG GGC GTC GAA GG 3'

US9 Bgl: 5'GGC CAG ATC TAT GAC GTC CCG GCT CTC CGA TCC 3'

US9 Nco: 5'GCG CCC ATG GGG CGG AGC AGC CAC ATC AGG AGC 3'

US11 Bgl: 5'GGC CAG ATC TAT GAG CCA GAC CCA ACC CCC G 3'

US11 Nco: 5'GCG CCC ATG GGT ACA GAC CCG CGA GCC GTA CG 3'

gE FOR: 5'GCG CAC TAG TAG GAA CGC CCA AAA CGT CCT GG 3'

gE REV: 5'CGC GAC TAG TTT ACC AGA AGA CGG ACG AAT CGG A 3'

2.7 Molekulargewichtstandards

50bp-Ladder	Pharmacia Biotech, Freiburg
100bp-Ladder	Pharmacia Biotech, Freiburg
KiloBase™ DNA Marker	Pharmacia Biotech, Freiburg
Broad Range Prestained SDS-Page Standards	Bio-Rad, München

2.8 Antikörper

anti-GFP-IgG mouse, monoklonal	Clontech, Heidelberg
DsRed Peptide Antibody rabbit	Clontech, Heidelberg
Biotin-conjugated goat-anti mouse IgG	Dianova, Hamburg
Biotin-conjugated goat-anti rabbit IgG	Dianova, Hamburg

2.9 Enzyme

Restriktionsenzyme:

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

Andere Enzyme:

Alkalische Phosphatase (CIAP)	GibcoBRL, Eggenstein
Streptavidin-Peroxidase	Calbiochem, Bad Soden
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Schwalbach
Taq-DNA-Polymerase	Pharmacia Biotech, Freiburg

2.10 Chemikalien/Reagenzien

Ampicillin	Sigma, München
Aqua ad injectabilia	Fresenius, Bad Homburg
BSA (Rinderserumalbumin)	New England Biolabs, Schwalbach

4-Chloro-1-Naphthol-Tabletten	Sigma, München
DABCO (<i>1,4-Diazalicyclo(2.2.2)octane</i>)	Sigma, München
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Histofluid	Engelbrecht, Edermünde
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma, München
Methanol	Riedel-deHaen, Seelze
MOPS (<i>3- bzw. 4-Morpholinepropanesulfonic acid</i>)	Sigma, München
Nusieve 3:1 Agarose	Biozym, Oldendorf
Reagenz C (Fixationslösung)	Argene Biosoft
Reagenz E (Permeabilitätslösung)	Argene Biosoft
D(+)-Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe
Seakem GTG Agarose	Biozym, Oldendorf
Thiomersal	Sigma, München
Wasserstoffperoxid 30%	Merck, Darmstadt

2.11 Reagentiensysteme

QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Qiaprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
DNA-Mini-Kit	Qiagen, Hilden
LipofectAMINE TM 2000 Reagent	GibcoBRL, Eggenstein
NuPage Western blotting Analysesystem	Novex, San Diego, USA

2.12 Puffer, Lösungen und Gelzusammensetzung

TE-Puffer	10mM Tris/HCl pH 7,4/7,6 1mM EDTA pH 8,0
-----------	---

Probenpuffer (für Agarosegele)	10% Saccharose 0,2% Xylencyanol 0,2% Bromphenolblau
TBE-Puffer	45mM Tris 45mM Borsäure 1mM EDTA pH 8,0
Ethidiumbromid-TBE-Puffer-Lösung	20µg EtBr 1000ml TBE-Puffer
Agarosegel	0,8-3% Agarose (NuSieve 3:1 bzw. Seakem GTG) TBE-Puffer

2.13 Geräte

CO ₂ -Begasungsbrutschrank	Heraeus, Düsseldorf
Hera Safe 15 (Sicherheitswerkbank)	Heraeus, Düsseldorf
Labor-Autoklav La-MCS-203	Asolf Wolf SANOClav, Geislingen
Pipettus-Akku (Pipettierhilfe)	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
PH 535 Multi Cal (pH-Meter)	WTW, Weilheim
Pro II Ne-1540 (Mikrowellenofen)	Panasonic, Japan
Thermocycler GeneAmp [®] PCR System 9700	Perkin-Elmer, Überlingen
Unitek HB-130 (Heizblock)	Salmon Electronics Ltd, England
UV-Tisch, Photodokumentationskamera	Biometra, Göttingen
Vortex Reax Top	Heidolph, Nürtingen
Elektrophoresenetzgeräte:	
Phero-Stab 0312	Biotec-Fischer, Reiskirchen
PharmaciaLKB-EPS 500/400	Pharmacia-LKB, Freiburg

Gelkammern:

Agarose-Horizontalgelkammer	Biotec-Fischer, Reiskirchen
Vertikal-Gelelektrophoresekammer XCell II (Polyacrylamidgele)	Novex, San Diego, USA

Mikroskope:

Axiovert 25	Zeiss, Jena
Axioplan 2	Zeiss, Jena

Waagen:

Kern 440-45	Gottl. Kern&Sohn, Albstadt
Sauter SM 1000	Sauter, Essen

Wasserbäder:

Wasserbad 7	Memmert, Schwalbach
Schüttelwasserbad 1086	GFL, Burgwedel
Ultraschallwasserbad Bransonic 220	Heinemann, Schwäbisch Gmünd

Zentrifugen:

Biofuge fresco	Heraeus, Düsseldorf
Biofuge 28 RS	Heraeus, Düsseldorf
Varifuge 3.0 R	Heraeus, Düsseldorf

2.14 Laborbedarf

Cryo Vials (Einfrierröhrchen)	Greiner, Solingen
Einmalspritzen 5ml	Becton Dickinson, USA
Filter 0,45µm Millex [®] -HA	Millipore S.A., Bedford
GEL-Blotting-Papier GB 002	Schleicher & Schuell, Dassel
Immobilon-P Transfer Membranes, PVDF	Millipore, Bedford
Mehrfachkulturplatten/Lochplatten	Greiner, Solingen
Mikroliterpipetten	Eppendorf, Hamburg
Objektträger	Engelbrecht, Edermünde

PCR-Röhrchen	Robbins Scientific, Kalifornien
Petrischalen	Greiner, Solingen
Probenröhrchen, 15 und 50ml	Greiner, Solingen
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg und Greiner, Solingen
Reaktionsgefäße 1,5ml	Eppendorf, Hamburg
Whatman 3MM-Papier	Whatman Ltd, England
Zellkulturflaschen	Greiner, Solingen

2.15 Filmmaterial

Elite Chrome 400	Kodak AG, Stuttgart
TURA 200 DX Chrome	Tura AG, Düren

3. Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Polymerasekettenreaktion

Mit der Polymerasekettenreaktion konnten die gewünschten DNA-Sequenzen amplifiziert werden. Die Primerpaare wurden so gewählt, dass eine für die PCR optimale Anlagerungstemperatur vorlag und die Amplifikate die für die folgenden Klonierungsschritte notwendigen Enzymschnittstellen enthielten. Ein Reaktionsansatz von 50µl setzte sich aus ca. 100ng Ziel-DNA, 0,2mM dNTPs, jeweils 0,5µM von beiden Primern, 1x PCR-Puffer, 25U Taq-DNA-Polymerase und x µl aqua bidest. zusammen.

Genregion	Primer	Zyklen	Annealing-Temperatur	Elongationszeit	Fragmentgröße
UL35	UL35 Bgl UL35 Nco	20	65°C	30sec	360bp
US9	US9 Bgl US9 Nco	20	69°C	30sec	290bp
US11	US11 Bgl US11 Nco	20	65°C	30sec	500bp
gE	gE FOR gE REV	25	53°C	1,5min	1610bp

Tab. 3 Primerpaare und PCR-Bedingungen für die Amplifikationen von UL35, US9, US11 und gE.

Im Thermocycler GeneAmp[®] PCR System 9700 (Perkin-Elmer, Überlingen) wurden zu Beginn der PCR die Ansätze bei einer Temperatur von 94°C für 5min inkubiert. Es folgten 20-25 Amplifikationszyklen, wobei 1 Zyklus folgende Schritte beinhaltete: 1min Denaturierung bei 94°C, für die Primer-Anlagerung je nach Länge des PCR-

Produktes 30-90sec bei der errechneten Annealing-Temperatur (s. Tab. 3) und 30sec DNA-Synthese bei 72°C. Nach dem letzten Zyklus wurde die Temperatur zunächst für 7min auf 72°C gehalten und dann auf 4°C gesenkt. Im 1,2%igen Agarosegel konnte die Größe des PCR-Amplifikates im Vergleich zu einem geeigneten Molekulargewichtsmarker überprüft werden. Nach Aufreinigung der DNA mit dem QIAQuick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) wurden die DNA-Fragmente in die Vektoren pGEM[®]-Teasy (Promega, Mannheim) oder pCR[®] 2.1-TOPO (Invitrogen, USA) kloniert.

3.1.2 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Für den Verdau der DNA wurde je nach Verwendungszweck ein Reaktionsvolumen von 10-20µl gewählt und in der Regel für 1-3h bei 37°C inkubiert. Dabei richtete sich die eingesetzte Enzymmenge nach der zu spaltenden DNA-Menge und der vom Hersteller empfohlene Reaktionspuffer wurde in einem entsprechenden Volumen hinzugefügt, so dass die Konzentration in Bezug auf das Reaktionsvolumen 1x war. Der Ansatz wurde mit aqua bidest. auf das gewünschte Reaktionsvolumen gebracht. Die Inaktivierung der Enzymrestaktivität erfolgte nach der Inkubation entweder durch Agarosegelelektrophorese mit anschließender Gelextraktion oder über das PCR Purification Kit (Qiagen).

3.1.3 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Bei Klonierungsexperimenten führen endständige 5'-Phosphatreste zur Religation der durch Restriktionsverdau linearisierten Vektor-DNA. Um die Wahrscheinlichkeit der Zirkularisierung während der Ligation zu minimieren, wurden die Phosphatreste durch die alkalische Phosphatase (CIAP: Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) entfernt. Hierzu erfolgt eine einstündige Inkubation der DNA mit CIAP bei 37°C mit nachfolgender Aufreinigung mittels PCR-Purification Kit.

3.1.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Das Enzym T₄-DNA-Ligase katalysiert den Einbau von DNA-Fragmenten in die mit Restriktionsenzymen verdaute Vektor-DNA. Ein Reaktionsansatz von 20µl wurde zusammengestellt aus ca. 20ng der gespaltenen und dephosphorylierten Plasmid-DNA, der zu inserierenden DNA in einem etwa 3-fachen molaren Überschuss, dem 1x Ligase-Puffer und aqua bidest.. Nach Zugabe von 1U T₄-DNA-Ligase erfolgte eine Inkubation in einem Wasserbad über Nacht bei 16°C.

3.1.5 Transformation von Bakterien

Zur Vermehrung von rekombinanten Plasmiden wurden transformationskompetente Bakterien der E.coli-Stämme JM 109 (Promega, Mannheim), DH5α oder DM 1 (Gibco BRL, Eggenstein) verwendet. 5-10µl des Ligationsansatzes wurden mit 50µl der langsam auf Eis aufgetauten, kompetenten Zellen vorsichtig gemischt. Eine 20-30-minütige Inkubation der Ansätze auf Eis ermöglichte die Adsorption der DNA an die Bakterienzelloberfläche. Danach erfolgte für die Einschleusung der Plasmid-DNA in die Bakterienzellen ein Hitzeschock für 45sec bei 42°C. Die Ansätze wurden für weitere 2min auf Eis gekühlt, anschließend in 950µl antibiotikafreiem SOC-Medium aufgenommen und im Schüttelwasserbad bei 37°C für 1-1,5h inkubiert, um die Expression des über das Plasmid aufgenommenen Antibiotikaresistenzgens zu induzieren, das ein Wachstum auf antibiotikahaltigen LB-Agar-Platten und somit die Selektion erfolgreich transformierter Bakterien ermöglichte. Die mit der Bakteriensuspension beimpften Platten wurden über Nacht bei 37°C im CO₂-Begasungsbrutschrank (Heraeus, Düsseldorf) inkubiert. Am nächsten Tag konnten gut abgrenzbare Bakterienkolonien mit der Pipette in 5ml antibiotikahaltiges LB-Medium überführt werden und sich im Schüttelwasserbad bei 37°C über Nacht vermehren.

3.1.6 Präparation von Plasmid-DNA

Die Isolation bakterieller Plasmid-DNA erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden).

Von den transformierten und über Nacht kultivierten Bakterienklonen wurde 1ml entnommen, diesem 400µl Glycerin zugesetzt und bei -20°C gelagert. Nach 10minütiger Zentrifugation der restlichen Bakterienkultur bei 1.520g folgte die Plasmidpräparation aus den Bakterienpellets unter Verwendung des kommerziellen Kits nach Herstellerangaben. Die Methode basiert auf einer alkalischen Lyse der Bakteriensedimente nach Birnboim&Doly und der selektiven Bindung der DNA an eine Silikamembran. Die aufgereinigte DNA wurde in 50µl TE-Puffer von der Säule eluiert. Durch einen Verdau der Plasmid-DNA mit anschließender analytischer Gelelektrophorese konnte der Erfolg der Plasmidpräparation überprüft werden.

3.1.7 DNA-Agarosegelelektrophorese und Fragmentelution

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe der Elektrophorese in horizontalen Agarosegelen durchgeführt. Die Gele hatten je nach Größe der erwarteten Fragmente eine Konzentration von 0,8-3% Seakem Agarose oder 3% NuSieve Agarose in TBE-Puffer.

Die analytische Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 200V und einer Laufzeit von 20 bis 30min. Für die Herstellung der Gele wurde TBE-Puffer mit 0,02µg/ml Ethidiumbromid verwendet, wobei durch die interkalierende Eigenschaft von Ethidiumbromid die DNA-Fragmente durch Anregung mit UV-Licht (366nm) sichtbar wurden und fotodokumentiert werden konnten.

Die präparative Auftrennung der DNA-Fragmente fand in der Regel bei 80V statt. Die mit TBE-Puffer ohne Ethidiumbromid hergestellten Gele hatten eine 0,8%ige Seakem Agarose-Konzentration. Die Geltaschen wurden wie folgt beladen: eine äußere mit einem Molekulargewichtsstandard, die benachbarte mit einer möglichst kleinen, zur Detektion ausreichenden Verdauemenge als spätere Orientierungshilfe und nach Freilassen der folgenden Tasche wurde das restliche Verdauvolumen auf die nächsten beiden Probenaschen verteilt.

Nach der 90minütigen Elektrophorese wurde das Gel mit einem Skalpell geteilt und die Hälfte mit dem DNA-Gewichtsstandard und dem zur Orientierung aufgetragenen Verdauvolumen für 10min in ethidiumbromidhaltigem TBE-Puffer angefärbt. Unter UV-Licht konnten die DNA-Fragmente sichtbar gemacht und die gewünschte Bande

mit dem Skalpell markiert werden. Diese Markierung diente als Orientierungshilfe beim Ausschneiden der zu isolierenden DNA-Fragmente aus der ungefärbten Gelhälfte. Das Gelstück wurde in ein 1,5ml-Röhrchen überführt. Die Fragmentelution erfolgte nach Herstellerangaben mit dem QIAgen Gel Extraction Kit. Je nach geplanter Weiterverwendung wurde die DNA in 30µl TE-Puffer oder aqua bidest. von der Säule eluiert.

3.2 Virusstock-Präparation

Die Infektion von Vero-Zellen zur Herstellung eines Standardviruspools wurde mit einer MOI von 0,01pfu/Zelle durchgeführt, um die Anzahl der entstehenden defekten Partikel möglichst gering zu halten. Mit vollständiger Ausbildung des zytopathischen Effektes nach 3tägiger Inkubation der Zellen bei 37°C erfolgte die Virusstock-Präparation. Nach Zentrifugation der Zellsuspension für 5min bei 867g, Beschallung des Pellets im Ultraschall-Wasserbad und erneuter Zentrifugation wurden die virushaltigen Überstände steril filtriert, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.3 Zellkulturtechniken

3.3.1 Zellkultur

Die Kultivierung von Vero-Zellen wurde in 75cm² Gewebekulturflaschen unter Standardbedingungen bei 37°C im CO₂-Begasungsbrutschrank (Heraeus, Düsseldorf) durchgeführt. Als Kulturmedium wurde das Minimum Essential Medium (MEM) verwendet, dem komplementinaktiviertes 2% FCS, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin, 2mM L-Glutamin und nicht-essentielle Aminosäuren zugesetzt wurden. Das Passagieren der Zellen erfolgte nach Bedarf. Dazu wurde zunächst das Medium entfernt, der adhärente Zellrasen mit PBS gewaschen und die Zellen mit 2,5ml 0,05% Trypsin in PBS 0,02% EDTA vom Kulturflaschenboden abgelöst. Das Volumen wurde mit frischem Medium auf 10ml ergänzt und die Zellsuspension dann in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:10 in Gewebekulturflaschen mit frischem Medium umgesetzt.

3.3.2 Transfektion von Zellen

Die Transfektion von Vero- und HeLa-Zellen erfolgte durch Lipofektion mit Lipofectamine™ 2000 Reagent (Gibco BRL). Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Bildung von Komplexen zwischen der negativ geladenen DNA und den kationischen Lipiden, wodurch eine Einschleusung der DNA in die Zelle ermöglicht wird. Die Zellen wurden am Vortag in 24-Lochplatten mit Medium ohne Antibiotika-zusatz ausgesät und inkubiert, so dass für die Transfektion ein bis zu 70-90% konfluenter Zellrasen zur Verfügung stand. Für einen Ansatz wurden ca. 0,5µg DNA und parallel dazu 3µl Lipofectamine™ 2000 Reagent mit jeweils 50µl serumfreiem Medium (Opti-MEM I) verdünnt. Nach Zusammenfügen der beiden Verdünnungen folgte eine 20minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden mit 0,5ml serumfreiem Medium gewaschen und mit dem Transfektionsansatz gleichmäßig umspült.

Nach Zugabe von 0,5ml serumfreien Medium wurden die Zellen für 3-5h bei 37°C inkubiert und anschließend ggf. mit HSV-1 infiziert oder mit 1ml frischem Vollmedium versorgt.

3.3.3 Infektion der Zellen mit HSV-1

Die in Lochplatten ausgesäten Zellen wurden mit einer MOI von 2,5-5pfu/Zelle infiziert. Die tiefgefrorene Virusstammlösung wurde zunächst bei RT aufgelöst und mit serumfreiem Medium bis zur gewünschten Konzentration verdünnt. Nach Abpipettieren des Nährmediums zur Infektion wurde die Viruslösung auf dem Zellrasen verteilt. Nach der einstündigen Inkubation bei 37°C wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit frischem Nährmedium bis zum gewünschten Zeitpunkt unter Standardbedingungen inkubiert.

3.3.4 Plaque-Assay zur Bestimmung des HSV-1-Titers

Zur Bestimmung des HSV-1-Titers diente eine Plaque-Assay. Aus einem aufgetauten Aliquot des bei -80°C gelagerten HSV-1-Virusstocks wurde hierzu eine Verdünnungsreihe mit dem Faktor 10 hergestellt. Die zu 70-90% konfluenten Vero-Zellen einer 24-Lochplatte wurden mit den Virusverdünnungsstufen 10^{-3} bis 10^{-8} infiziert, wobei für jede Verdünnungsstufe 4 Vertiefungen mit Zellen zur Verfügung standen, die jeweils mit $200\mu\text{l}$ der Virus-Lsg. für 1h bei 37°C inkubiert wurden. Nach Entfernen nicht adsorbierter Virionen wurden die Zellen mit 0,5% carboxymethylzellulosehaltigem Kulturmedium überschichtet und 3 Tage bei 37°C inkubiert. Aufgrund des zytopathischen Effektes der Virusinfektion wies der Zellrasen Plaques auf, die bei einer geeigneten Verdünnungsstufe unter dem Lichtmikroskop gezählt wurden. Die Bestimmung des Virustiters erfolgte unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors in pfu(plaque forming units)/ml.

3.4 Techniken zur Proteindetektion

3.4.1 Lyse der Zellen

Die Proteinproben zur Durchführung der SDS-Polyacrylamidelektrophorese wurden aus transfizierten und ggf. mit HSV-1 infizierten Vero-Zellen gewonnen. Die in 24-Lochplatten ausgesäten Zellen wurden dazu mit PBS gewaschen, mit einer Pipettenspitze vom Untergrund abgelöst, in PBS aufgenommen und anschließend bei $1000\times g$ für 8min zentrifugiert. Nach Abpipettieren des Überstandes erfolgten die Aufnahme der Pellets in $500\mu\text{l}$ PBS und eine zweite Zentrifugation bei $10000\times g$ für 2min. Die Pellets wurden in $50-70\mu\text{l}$ 1x NuPAGE SDS-Probenpuffer mit Reducing Agent (Novax) resuspendiert und für 10min bei 70°C inkubiert.

In der Folge konnten die Proben nun im abgekühlten Zustand für die Elektrophorese verwendet oder zunächst bei -20°C gelagert werden.

3.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamidelektrophorese wandern die Proteine, die durch das Natriumdodecylsulfat (SDS) eine negative Ladung erhalten, durch das Gel zur Anode und lassen sich dabei aufgrund ihres Molekulargewichtes auftrennen.

Neben 10µl eines Molekulargewichtsmarkers wurden von den Proteinproben jeweils 10-15µl auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamid-Fertiggel (Novex) aufgetragen. Die Durchführung der elektrophoretischen Auftrennung erfolgte nach Herstellerangaben in der mit Laufpuffer gefüllten Gelelektrophoresekammer (X Cell II, Novex) und dauerte bei 200V und 125mA 35min.

3.4.3 Western-Blot

Zunächst wurden die in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine elektrophoretisch auf eine proteinbindende PVDF(Polyvinylidendifluorid)-Membran transferiert, um sie für die Reaktion mit spezifischen Antikörpern zugänglich zu machen. Der Proteintransfer erfolgte in dem X Cell II Blot Module (Novex), in dem entsprechend nach Herstellerangaben die PVDF-Membran auf das proteintragende Polyacrylamid-Gel zwischen Schwämmen und Filterpapieren in Blotpuffer gelegt wurde, und dauerte bei 30V und 175mA 60min. Nach Beendigung des Transfers wurde die Blotmembran für 1,5h bei RT in 5ml Blocklösung (1% (w/v) Milchpulver in PBS) auf einem Schüttler inkubiert, um eine unspezifische Antikörperbindung durch Absättigung überschüssiger Proteinbindestellen der Membran zu vermeiden. Nach dem Blocken wurde die Membran in der Erst-Antikörper-Lösung (Antikörper in PBS, 3% BSA, 0,05% Thiomersal) über Nacht im Rotorinkubator bei RT inkubiert. Die Entfernung nicht gebundener Antikörper erfolgte durch dreimaliges Waschen für jeweils 5min. Der Puffer für die Waschschritte und die folgenden Verdünnungen bestand aus PBS mit 3% BSA und 0,05% Thiomersal. Die Nachweisreaktion wurde mit der Detektion des Antigen-Antikörper-Komplexes fortgesetzt. Diese erforderte einen Biotin-gekoppelten Zweitantikörper (goat-antimouse biotin bzw. goat-antirabbit biotin), der an die konstanten Bereiche des Erst-Antikörpers bindet und in der Verdünnung 1:1000 für 1h bei RT auf die Membran gegeben wurde. Anschließend folgten 3

Waschschritte und die Inkubation für 30-45min auf dem Schüttler in 1:1000 verdünnter Streptavidin-Peroxidase. Die Blotmembran wurde dreimal wie zuvor und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Entwicklung des Blots mit der Substratlösung (PBS, 10% Methanol, 0,03% (w/v) 4-Chloronaphthol, 0,03% (w/v) H₂O₂). Die Farbreaktion wurde durch aqua bidest. gestoppt und die Membran zwischen Filterpapieren (Whatman 3MM, Whatman Ltd.) getrocknet. Das Molekulargewicht der von den Antikörpern erkannten Proteine konnte durch Vergleich mit den vorgefärbten Standardproteinmolekulargewichten (BioRad) bestimmt werden.

Einsatz für	Hersteller	Exzitation	Beamsplitter	Emission
GFP	Zeiss	470	493	505
FITC	Zeiss	450-490	510	520
TRITC	Zeiss	530-585	600	615
DAPI	Zeiss	365	395	420
DAPI/FITC/TRITC	Zeiss	400/495/570	410/505/585	460/530/610
ECFP	AHF	436	460	480
EGFP	AHF	470	495	525
ECFP/EYFP/DsRed	AHF	435/495/575	470/540/625	460/525/630
Cy3	AHF	545	565	610
EYFP	AHF	500	515	535
DsRed	AHF	565	585	620

Tab. 4 Fluoreszenzmikroskopfilter mit den jeweiligen Exzitations- und Emissionsmaxima.

3.4.4 Fluoreszenzmikroskopie

Die mit den autofluoreszierenden Fusionsproteinen transfizierten und ggf. virusinfizierten Zellen befanden sich auf Deckgläschen in 24-Lochplatten. Nach zweimaligem Waschen mit 500µl PBS wurden die Zellen zur Fixation mit Lösung

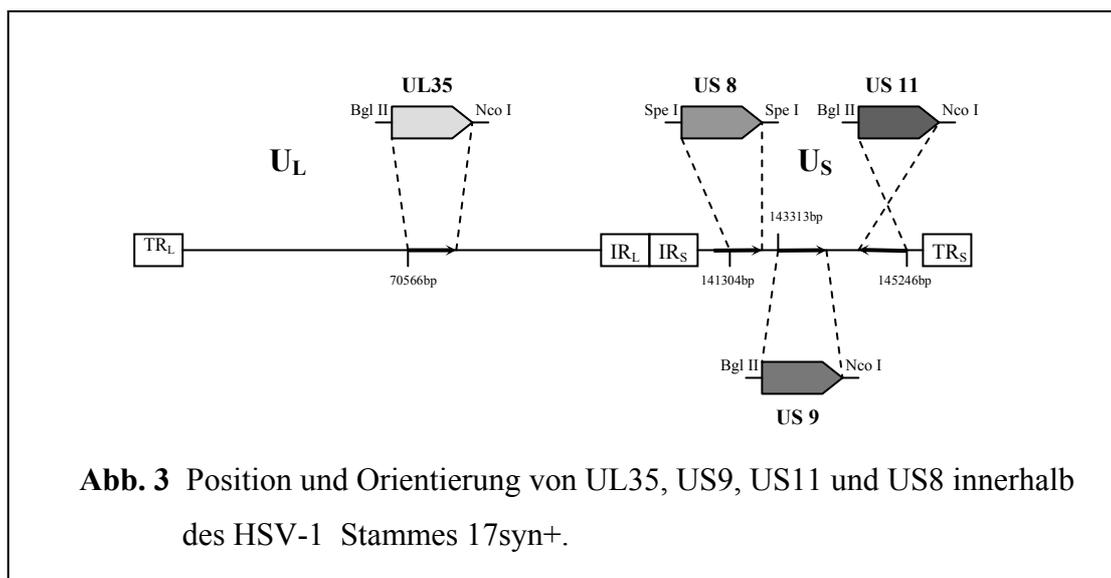
Reagenz C (Argene Biosoft) in einer 1:5-Verdünnung für 10min bei RT inkubiert. Auf ein erneutes Waschen mit PBS folgten eine 5minütige Inkubation in der Permeabilisationslösung Reagenz E (Argene Biosoft) bei RT und ein abschließendes Waschen. Zur Mikroskopie wurden die Deckgläschen auf Objektträgern mit der zellbeschichteten Seite in Glyzerol/PBS-Lösung (9:1) mit 2,5% (w/v) DABCO (Sigma) eingebettet und mit Histofluid (Engelbrecht/Edermünde) an den Rändern befestigt. Nach Säubern der Deckgläschenoberseite mit aqua bidest. konnte die Verteilung der fluoreszierenden Proteine in Vero- und HeLa-Zellen mit entsprechenden Filtern der Firmen Zeiss und AF (Tab. 4) unter dem Axioplan 2 Mikroskop dargestellt und dokumentiert werden.

4. Ergebnisse

4.1 PCR-Amplifikation

Bei der Amplifikation der ausgewählten Virusnukleinsäuresequenzen diente das Genom des HSV-1 Stammes 17syn+ als Zielsequenz. Position und Orientierung dieser Sequenzen sind in der Abb. 3 dargestellt. Die *forward*- und *backward*-Primer (Tab. 5, 6, 7) für die jeweilige Protein-kodierende DNA-Region wurden so zusammengestellt, dass die für die Insertion in den Expressionsvektor benötigten Restriktionsenzymstellen an den 5'- und 3'-Termini der Amplifikate zur Verfügung standen. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Enzyme ein Zusammenfügen der Virusprotein- und Autofluoreszenzmarkerproteinsequenzen im intakten Leserahmen erlaubten.

Die PCR-Amplifikate wurden mit dem PCR-Purification Kit aufgereinigt und anschließend in die Vektoren pGEM-T[®] easy und pCR[®]2.1-TOPO[®] zwischenkloniert.



4.1.1 UL35

Die 336bp große Genregion UL35 trägt die Information für das Kapsidprotein VP26 und erstreckt sich von Position 70566 bis 70904 des HSV-1-Genoms (Stamm 17syn+). Mit den Primern (Tab. 5) wurden den Sequenzen die Schnittstellen BglII (5'-Ende bzw. N-terminal) und NcoI (3'-Ende bzw. C-terminal) angefügt.

fw: UL35 BGL

— BglII—
5'-GGC C AGATCT ATG GCC GTC CCG CAA TTT CAC C-3'

bw: UL35 NCO

— NcoI—
5'-GCG C CCATGG GGG TCC CGG GCG TCG AAG G-3'

Tab. 5 *forward*(fw)- und *backward*(bw)-Primer zur Amplifikation der UL35-Sequenz.

Um bei der Vervielfältigung der DNA-Region mittels PCR die Anzahl fehlerhafter DNA-Fragmente niedrig zu halten, wurde bei der Durchführung der PCR zunächst eine Zyklenzahl von 10 gewählt. In der elektrophoretischen Analyse zeigte sich jedoch eine schwache Bandenintensität als Hinweis auf eine geringe Amplifikatanzahl. Es wurden daraufhin 10 weitere Zyklen durchgeführt mit nachfolgend ausreichendem Anstieg der Konzentration des ca. 360bp-Fragmentes (Abb. 4).

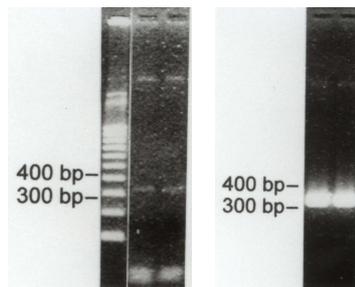


Abb. 4

Analytische Agarosegelelektrophorese des PCR-Amplifikates UL35 nach 10 Zyklen (links) und 20 Zyklen (rechts).

4.1.2 US9 und US11

Die kodierenden Sequenzen für die Tegumentproteine US9 und US11 besitzen eine Größe von 270bp (US9, Position 143313 bis 143585) und 483bp (US11, Position 145246 bis 144761). An den 5'-Terminus der Primer-DNA wurde die Sequenz für die BglII-Schnittstelle addiert, das 3'-Ende wurde mit der NcoI-Sequenz versehen. Eine ausreichende Konzentration der gewünschten DNA-Fragmentgrößen wurde nach 20 Amplifikationszyklen erzielt (Abb. 5).

(1) fw: US9 BGL

— Bgl II—
5'-GGC C AGATCT ATG ACG TCC CGG CTC TCC GAT CC-3'

bw: US9 NCO

— Nco I—
5'-GCG C CCATGG GGC GGA GCA GCC ACA TCA GGA GC-3'

(2) fw: US11 BGL

— Bgl II—
5'-GGC C AGATCT ATG AGC CAG ACC CAA ACC CCC G-3'

bw: US11 NCO

— Nco I—
5'-GCG C CCATGG GTA CAG ACC CGC GAG CCG TAC G-3'

Tab. 6 Sequenzen der Primerpaare zur Amplifikation von US9 (1) und US11 (2). Die für die Klonierungen eingefügten Enzymschnittstellen sind markiert.

fw: forward-Primer, bw: backward-Primer

4.1.3 US8

Der kodierende Bereich für das Hüllprotein gE nimmt auf dem HSV-1-Genom (Stamm 17) den Bereich von Position 141243 bis 142895 ein. Für das Fusionsprotein gEEGFP wurde die gE-kodierende DNA-Region nicht vom Startcodon aus, sondern ab Position +61, bezogen auf die Transkriptionsinitiationsstelle (141243) per PCR amplifiziert. Der deletierte Bereich kodiert für das Signalpeptid, das in den folgenden Klonierungsschritten durch das funktionell vergleichbare Signalpeptid des Glykoprotein H ersetzt wurde.

fw: gE FOR

— Spe I—
5'-GCG C ACTAGT AGG AAC GCC CAA AAC GTC CTG G-3'

bw: gE REV

— Spe I—
5'-CGC G ACTAGT TTA CCA GAA GAC GGA CGA ATC GGA-3'

Tab. 7 Primerpaar zur Amplifikation der US8-(gE-)Sequenz.

fw: forward-Primer, bw: backward-Primer

Die Amplifikation der gE-Sequenz ohne Signalpeptid erfolgte mit SpeI-Schnittstellen tragenden Primern und führte nach 25 Zyklen und einer Elongationszeit von 90sec zu einer ausreichenden Menge des ca. 1610bp großen DNA-Fragmentes (Abb. 6)

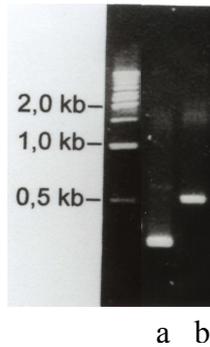


Abb. 5
Analytisches Gel des
PCR-Ansatzes von
US9(a) und US11(b).

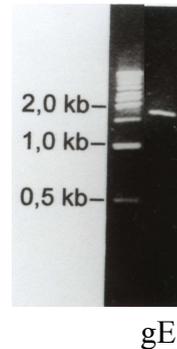


Abb. 6
gE-DNA im analytischen
Gel nach PCR im
Vergleich mit kb-ladder.

4.2 Insertion der PCR-Amplifikate in Klonierungsvektoren

Die Zwischenklonierung der gereinigten PCR-Produkte in die High copy-Plasmide pGEM[®]-T easy (Promega) oder pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen) erfolgte, um die folgenden Klonierungsexperimente zu erleichtern.

Die Durchführung der Ligation der ungeschnittenen amplifizierten Sequenzen in die Vektoren orientierte sich an den Protokollen der Hersteller. Die Fragmente UL35, US9 und US11 wurden jeweils in pGEM[®]-T easy inseriert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Demgegenüber reichte für die Insertion von gE in pCR[®]2.1-TOPO[®] nach der TOPO-TA-Technologie eine fünfminütige Inkubation bei RT aus.

Nach der Ligation folgte die Transformation der Plasmide in kompetente Bakterien (E. coli JM109 für pGEM[®]-Teasy und E. coli One Shot[®]-Zellen für pCR[®]2.1-TOPO[®]) mit anschließender Ausplattierung auf Ampicillin/IPTG/X-Gal-haltigen Agarplatten. Beide Vektorsysteme benutzen das Prinzip der Blau/Weiss-Selektion, welches auf der Unterbrechung der kodierenden Sequenz des α -Peptids der β -Galactosidase basiert. Durch Einfügen der DNA-Fragmente in den Bereich des lacZ-Gens wird dieses inaktiviert und der enzymatische Abbau von X-Gal zu einem blauen Produkt bleibt aus. Insert-haltige Klone erscheinen daher weiß und lassen sich so einfach von Klonen mit Vektorreligation unterscheiden.

In der Folge wurden ca. 10 weiße Kolonien gepickt, in Ampicillin-haltigem Nährmedium kultiviert und eine Plasmidisolation durchgeführt. Um den Erfolg der Klonierung und die Orientierung des Inserts im Plasmid zu überprüfen, wurde die Vektor-DNA mit geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten und mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Für die anschließenden Klonierungsschritte konnten so die Klone mit dem gewünschten PCR-Fragment auffindig gemacht werden.

4.3 Klonierung der Virusproteinsequenzen in fluoreszenzmarkertragenden Transfervektoren

4.3.1 Transfervektor pBacMam2gDproEGFP

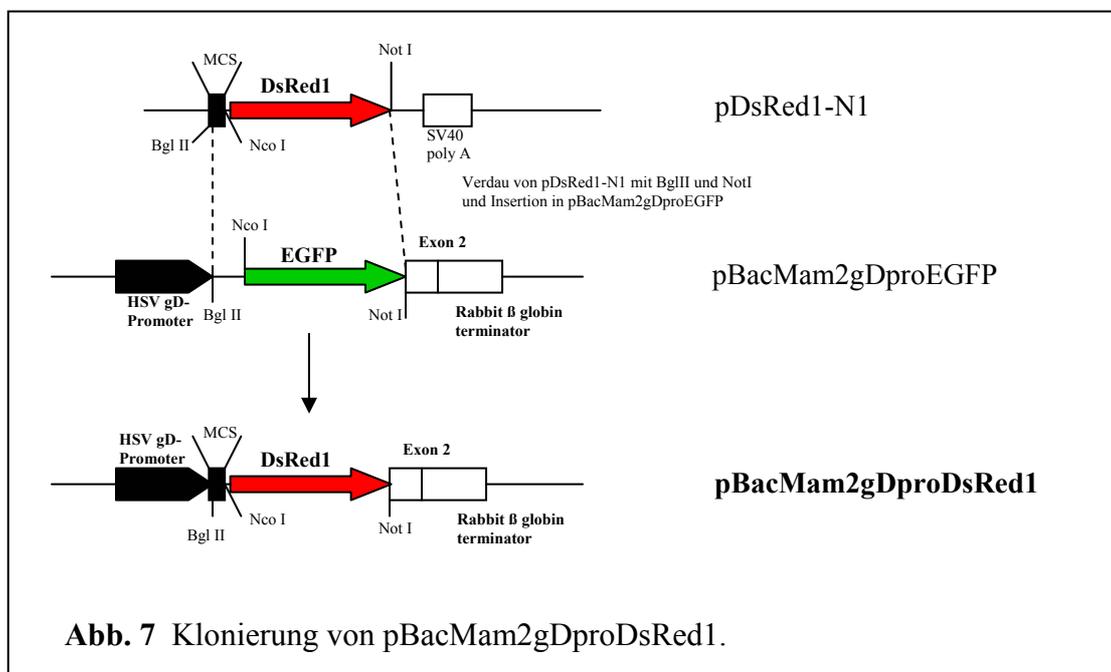
Als Ausgangsvektor für die folgenden Klonierungen wurde mir von A. Heid der von ihm konstruierte pBacMam2gDproEGFP-Vektor (Abb. 8) zur Verfügung gestellt. Das 7121bp grosse Plasmid bietet die Möglichkeit, über die singulären Schnittstellen beidseits der EGFP-Sequenz fremde DNA aufzunehmen. Die Virusproteinsequenzen konnten so entweder an ihrem N- oder C-terminalen Ende markiert und in Kombination mit dem autofluoreszierenden Reporter gen unter Kontrolle des gD-Promotors exprimiert werden. Da das Plasmid zur Selektion transformierter Bakterien das Ampicillin trägt, wurde den bei den Klonierungsschritten benötigten Nährmedien dieses Antibiotikum zugesetzt.

4.3.2 Konstruktion von pBacMam2gDproEYFP, pBacMam2gDproECFP und pBacMam2gDproDsRed1

Ausgehend von pBacMam2gDproEGFP wurden Transfervektoren mit Fluoreszenzproteinen unterschiedlicher Emissionsspektren konstruiert. Durch Austausch von EGFP gegen EYFP, ECFP oder DsRed1 ließen sich die einzelnen Virusproteine verschiedenfarbig markieren. Dieses ermöglichte die gleichzeitige Detektion mittels Fluoreszenzmikroskopie bei Expression verschiedener Fusionsproteine in einer Zelle.

Die Konstruktion von pBacMam2gDproEYFP zur Insertion der Tegumentprotein-DNA wird in 4.3.4 erläutert. Analog hierzu wurde auch der Austausch des EGFP-Fragmentes in pBacMam2gDproEGFP durch die ECFP-Sequenz aus pECFP-1 (Clontech) zwischen den NcoI- und NotI-Schnittstellen vorgenommen.

Zur Herstellung von pBacMam2gDproDsRed (Abb. 7) wurde die für das DsRed1 codierende Sequenz durch Verdau des Plasmids pDsRed1-N1 (Clontech) mit BglII und NotI herausgeschnitten. Das ca. 670bp große Fragment ersetzte bei der Ligation die EGFP-enthaltene DNA-Region, die durch Öffnen des Vektors pBacMam2gDproEGFP mit BglII und NotI ausgenommen wurde.



4.3.3 Klonierung der Fusionsproteine UL35EGFP und UL35ECFP

4.3.3.1 pBacMam2gDproUL35EGFP

Zur Konstruktion von pBacMam2gDproUL35EGFP wurde das in pGEM-Teasy zwischenklonierte UL35-Fragment mit den Enzymen BglII und NcoI herausgeschnitten, durch ein präparatives Gel aus dem Verdauansatz isoliert und anschließend in den mit BglII und NcoI geöffneten Vektor pBacMam2gDproEGFP N-terminal zur EGFP-

Sequenz *in frame* inseriert. Nach Transformation in *E.coli* DM1 wurden Plasmide aus 10 Bakterienklonen isoliert und durch einen Verdau mit BglII und NcoI überprüft, wobei im analytischen Gel (Abb. 10) neben der DNA des linearisierten Vektors (ca. 7050bp) ein ca. 350bp grosses Fragment (UL35) sichtbar werden musste. Die Insert-tragenden Plasmide wurden für die Transfektion verwendet.

4.3.3.2 pBacMam2gDproUL35ECFP

Da sich aufgrund der ähnlichen Emissionsspektren die EYFP-markierten Proteine mit dem UL35EGFP-Konstrukt bei simultaner Expression in einer Zelle mit herkömmlicher Technik nicht unterscheiden lassen, wurde das UL35-Protein zusätzlich noch mit ECFP fusioniert. Das EGFP in pBacMam2gDproUL35EGFP wurde über die Schnittstellen NcoI und NotI durch die ECFP-Sequenz aus p-ECFP1 (Clontech) ersetzt (Abb. 9). Nach Inkubation der Klone mit den Enzymen NcoI und NotI war in der Auftrennung mittels Gelelektrophorese ein ca. 700bp großes Fragment zu sehen (Abb. 11). Dass es sich dabei tatsächlich um das ECFP-Gen handelt, konnte bei der Expression des Reportergens über die blaue Autofluoreszenz in Vero-Zellen nachgewiesen werden.



Abb. 8 pBacMam2gDproUL35EGFP-Verdau mit BglII und NcoI.

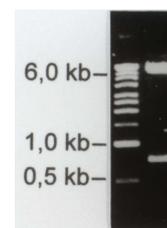


Abb. 9 pBacMam2gDproUL35ECFP-Verdau mit NcoI und NotI.

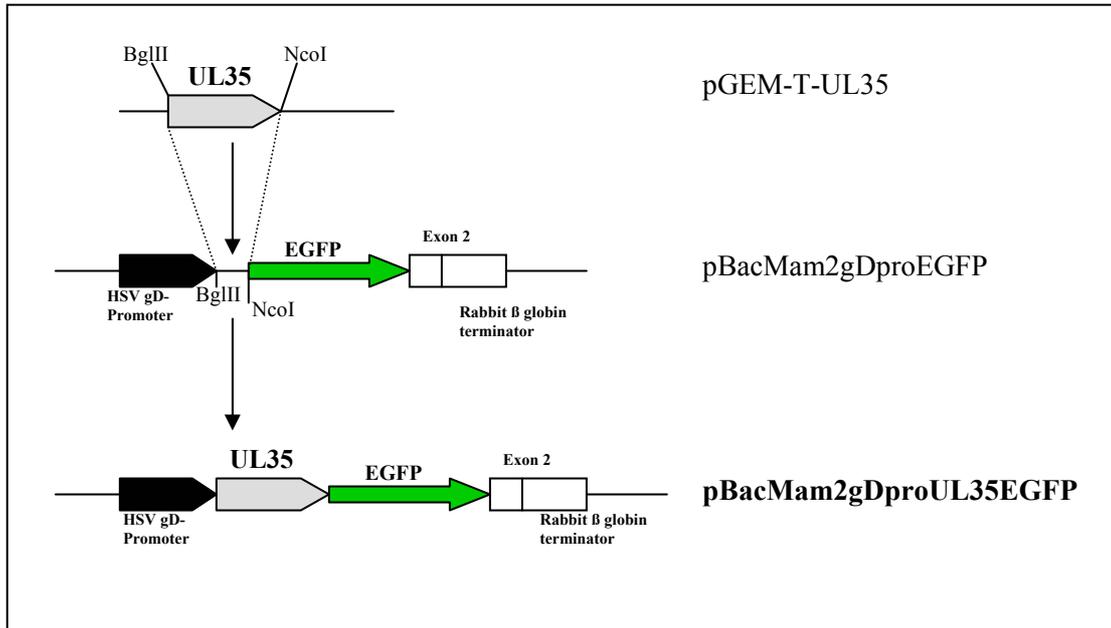


Abb. 10 Konstruktion des Vektors pBacMam2gDproUL35EGFP.

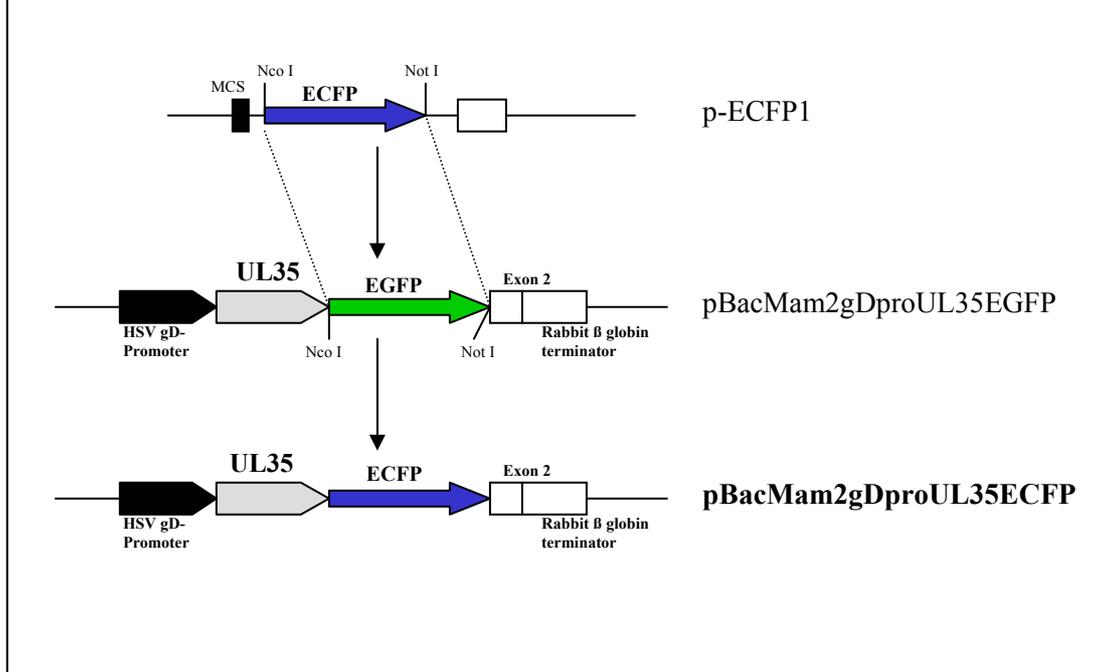
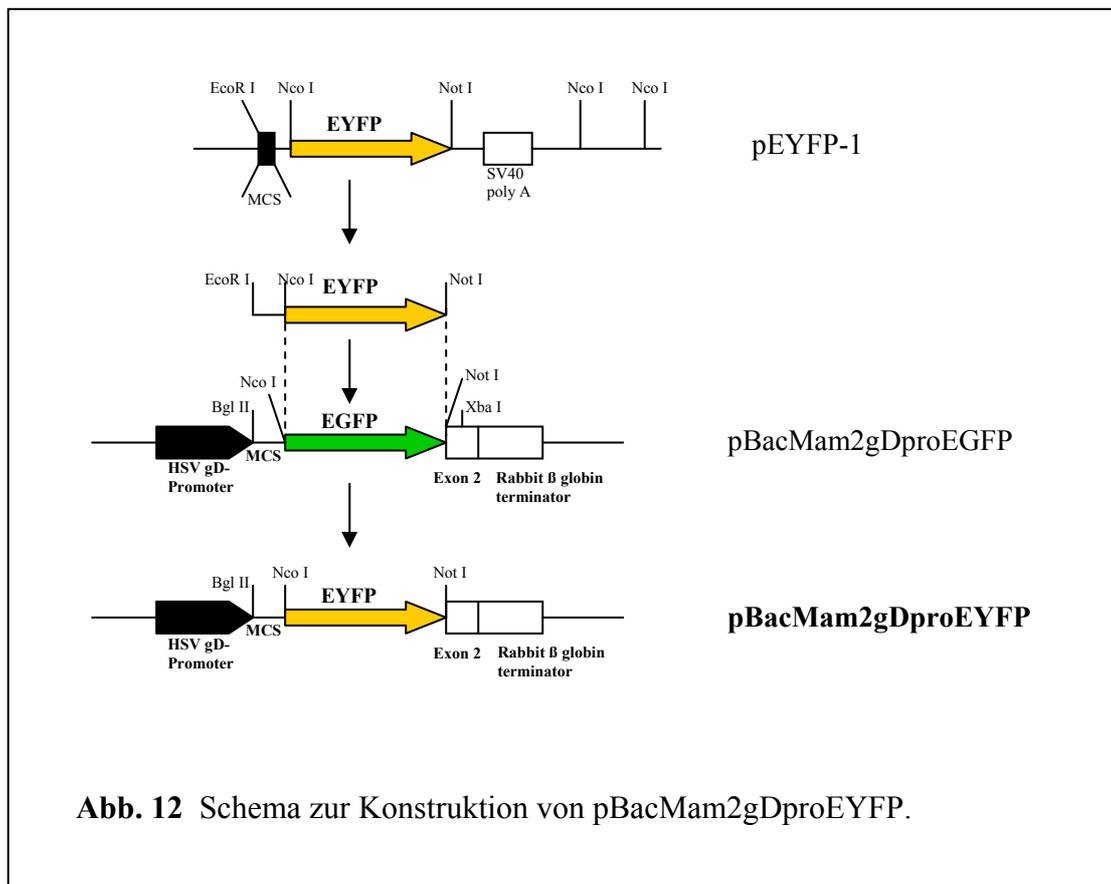


Abb. 11 Klonierung von pBacMam2gDproUL35ECFP.

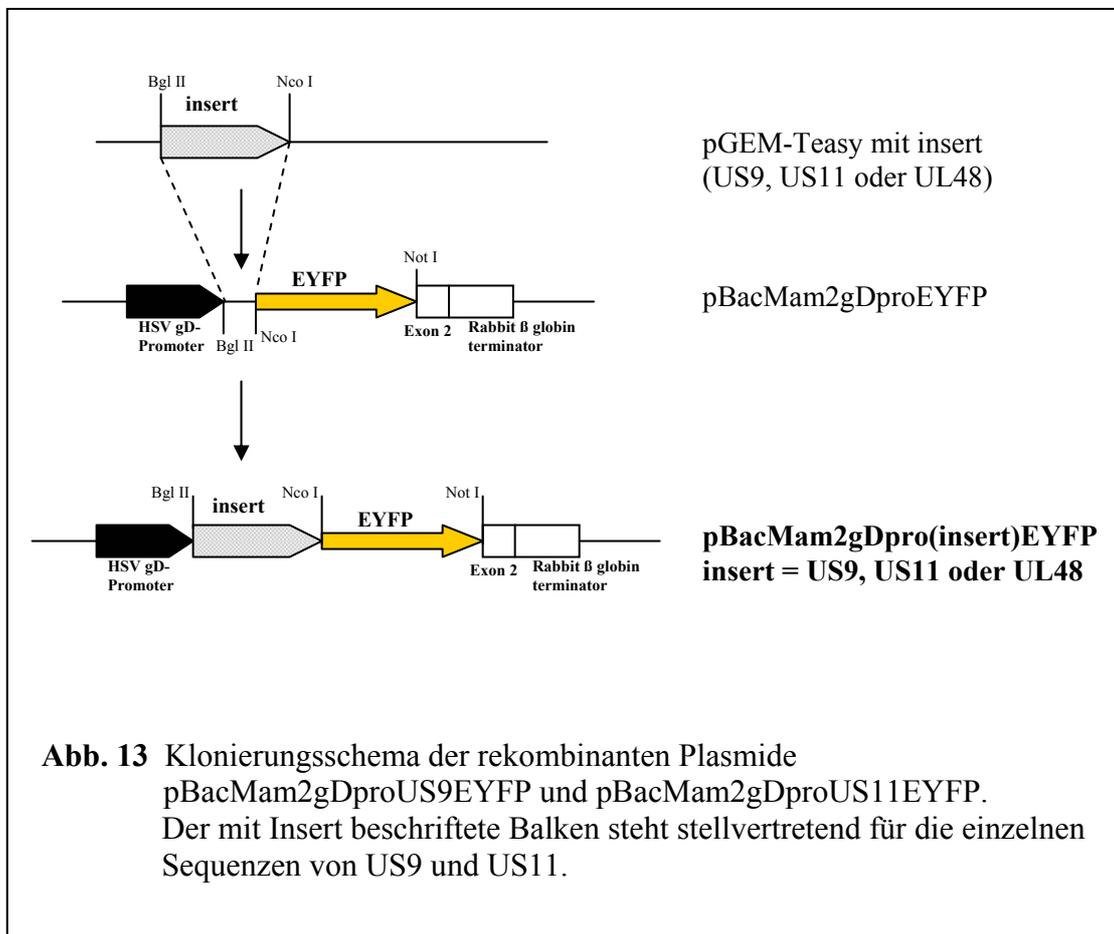
4.3.4 Markierung der Tegumentproteinsequenzen US9 und US11 mit EYFP

Um die aus den einzelnen Tegumentproteinen und EYFP bestehenden Fusionsproteine zu klonieren, erfolgte zunächst die Herstellung von pBacMam2gDproEYFP (Abb. 12). Das EYFP-Gen stammte aus dem Vektor pEYFP-1. Da dieser durch Verdau mit NcoI und NotI in ungefähr gleich große Fragmente zerfiel, die eine genaue Identifikation der EYFP-Bande in der Gelelektrophorese nicht gestattete, wurde ein sequentieller Verdau vorgenommen. Das EYFP-Fragment wurde zunächst durch NotI und EcoRI aus pEYFP-1 herausgeschnitten, nach Aufreinigung mit NcoI verdaut und als NcoI/NotI-Fragment in den Vektor pBacMam2gDproEGFP an die Stelle des EGFP-Gens kloniert. Die korrekte Insertion von EYFP wurde durch Schneiden der Plasmidklone mit NcoI und NotI geprüft und durch die mit einem EYFP-Filter erfasste gelb-grüne Fluoreszenz transfizierter Vero-Zellen bestätigt.



4.3.4.1 pBacMam2gDproUS9EYFP und pBacMam2gDproUS11EYFP

Ausgehend von einem korrekten pBacMam2gDproEYFP-Klon und den in pGEM-T easy zwischenklonierten US9- und US11-Fragmenten konnten die codierenden Sequenzen der Tegumentproteine mit EYFP fusioniert werden (Abb. 13). Die Klonierung der einzelnen DNA-Fragmente in pBacMam2gDproEYFP setzte sich aus den üblichen Schritten zusammen und führte zu den rekombinanten Plasmiden pBacMam2gDproUS9EYFP und pBacMam2gDproUS11EYFP. Die Insertion erfolgte dabei über BglIII- und NcoI-Schnittstellen am N-Terminus von EYFP.



4.3.5 Klonierung der Hüllproteine gL und gE in Expressionsvektoren

4.3.5.1 Herstellung von pBacMam2gDprogLDsRed1

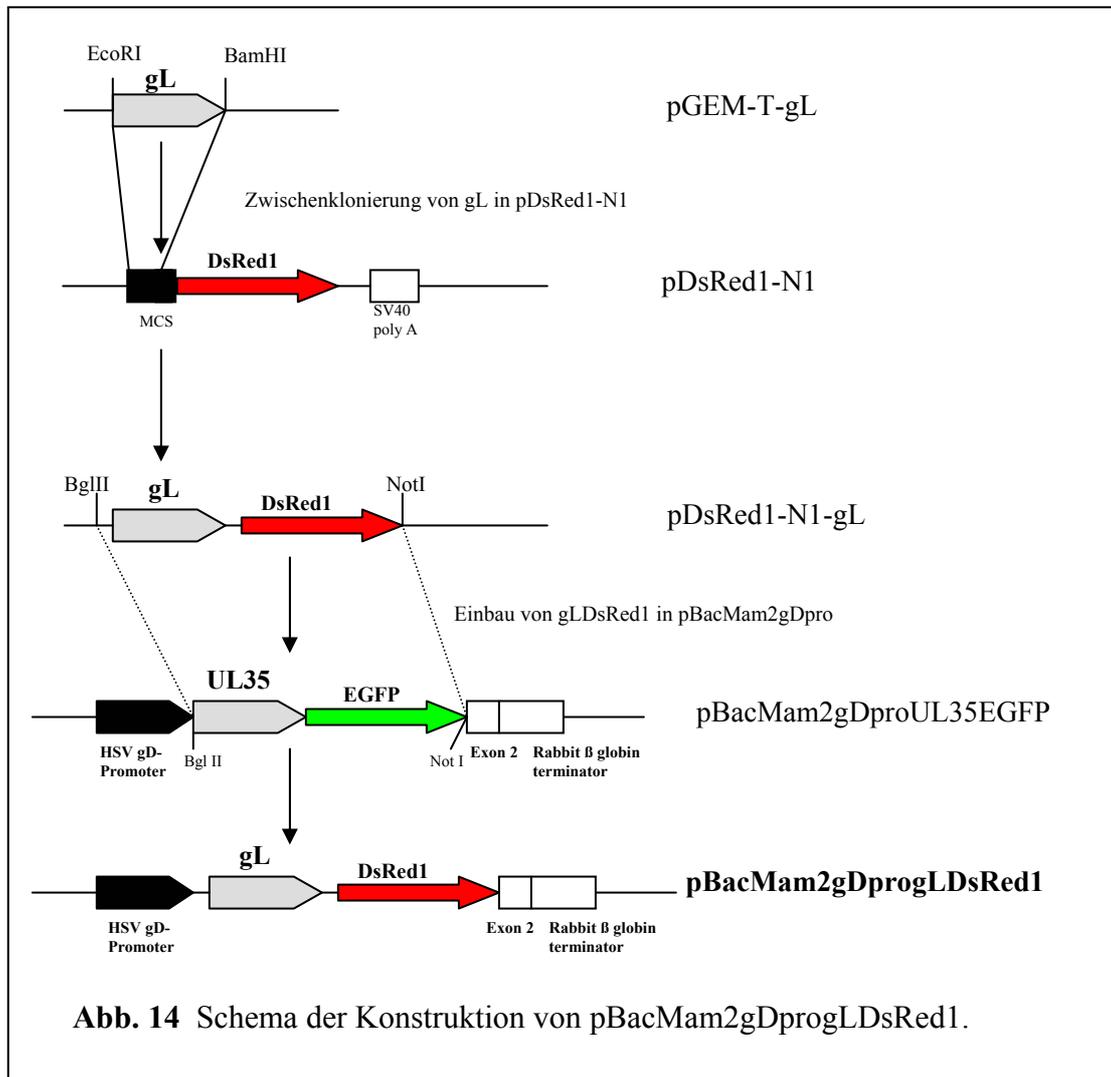
Zur Konstruktion eines Fusionsproteins mit dem HSV-1-Glykoprotein L wurde das im Institut hergestellte Plasmid pGEM-T-gL zur Verfügung gestellt. Die bei der Amplifikation mit den Enzymschnittstellen EcoRI und BamHI versehene gL-Sequenz sollte mit DsRed1 verbunden werden, um bei der Expression zusammen mit Kapsid- und Tegumentproteinen zwischen den Fusionskonstrukten differenzieren zu können. Da die Enzyme EcoRI und BamHI mehrfach in pBacMam2gDproEGFP oder auch pBacMam2gDproDsRed1 schneiden, war ein direktes Einsetzen des gL-Fragmentes in diese Vektoren nicht möglich. Dieses machte einen Zwischenschritt mit Subklonieren des gL-Fragmentes in pDsRed1-N1 notwendig (Abb. 14).

Subklonierung des gL-Fragmentes in pDsRed1-N1

Die gL-Sequenz wurde durch Schneiden mit EcoRI und BamHI des Vektors pGEM-T-gL und Auftrennung per Gel mit Fragmentelution isoliert und in den mit gleichen Enzymen geöffneten pDsRed1-N1-Vektor in die zu DsRed1-Gen N-terminal gelegene multiple cloning site ligiert. Da pDsRed1-N1 das Kanamycin-Resistenzgen trägt, wurden die transformierten DM1-E.coli-Zellen auf kanamycinhaltigen Agar-Platten bzw. Nährmedium gezüchtet. Die pDsRed1-N1-gL-Klone wurden durch einen BglII/NotI-Verdau kontrolliert und die für richtig befundenen Plasmide in Vero-Zellen eingeschleust. Bei unverschobenem Leseraster kam es unter Kontrolle des CMVie-Promotors zur Expression einer dem gL-Verteilungsmuster entsprechenden roten Fluoreszenz in den Zellen.

Konstruktion von pBacMam2gDprogLDsRed1

Ein stark fluoreszierender pDsRed1-N1-gL-Klon und der Vektor pBacMam2gDproEGFP stellten die Ausgangsvektoren für die Konstruktion von pBacMam2gDprogLDsRed1 dar (Abb. 14).



Aus pDsRed1-N1-gL wurde mit BglIII und NotI das gL-DsRed1-Insert herausgeschnitten. Die gleichen Restriktionsendonukleasen führten bei pBacMam2gDproEGFP zur Deletion des EGFP-Fragmentes inklusive MCS, an dessen Stelle sich dann das gL-Fusionsgen klonieren ließ. Nach Doppelverdau der rekombinanten Plasmide mit BglIII und NotI entstanden ein 6.350bp-Fragment und das 1.360bp große gL-DsRed1-Fragment (Abb. 15).

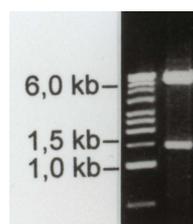


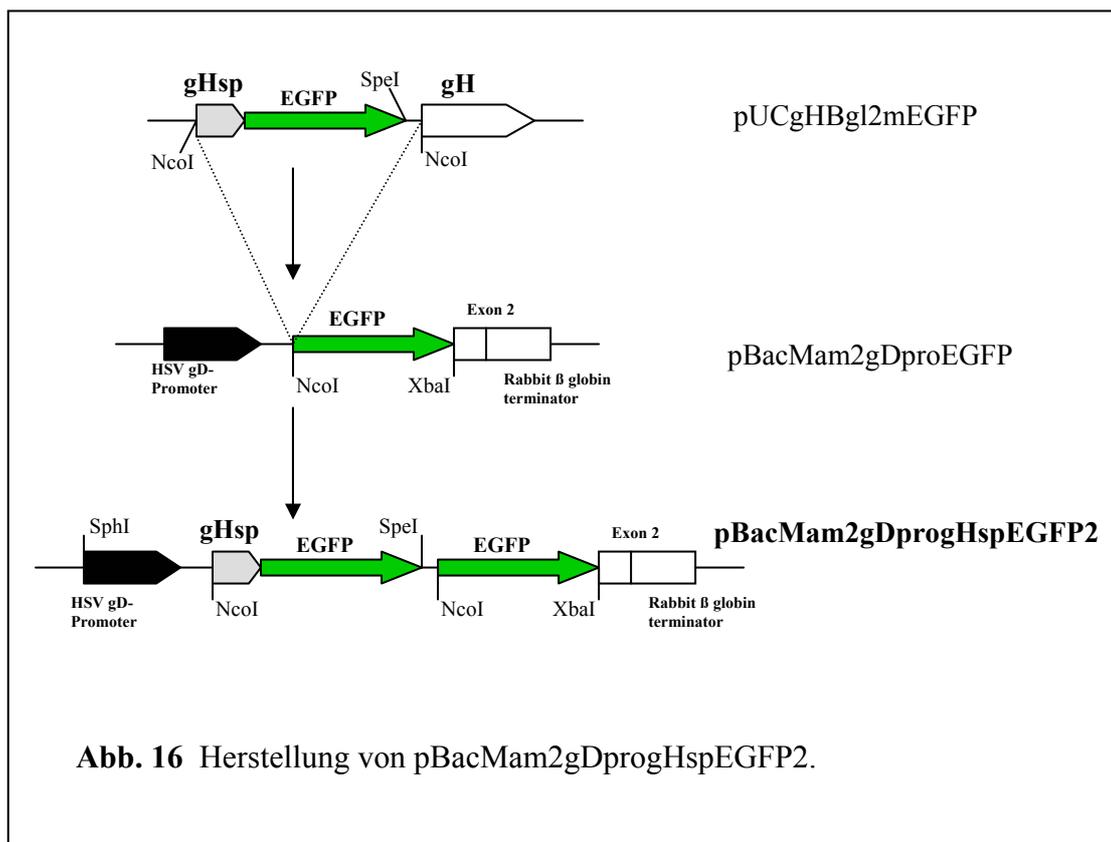
Abb. 15

Analytisches Gel des Verdaus des Vektors pBacMam2gDprogLDsRed1 mit BglIII und NotI.

4.3.5.2 Klonierung von pBacMam2gDprogHspEGFPgE

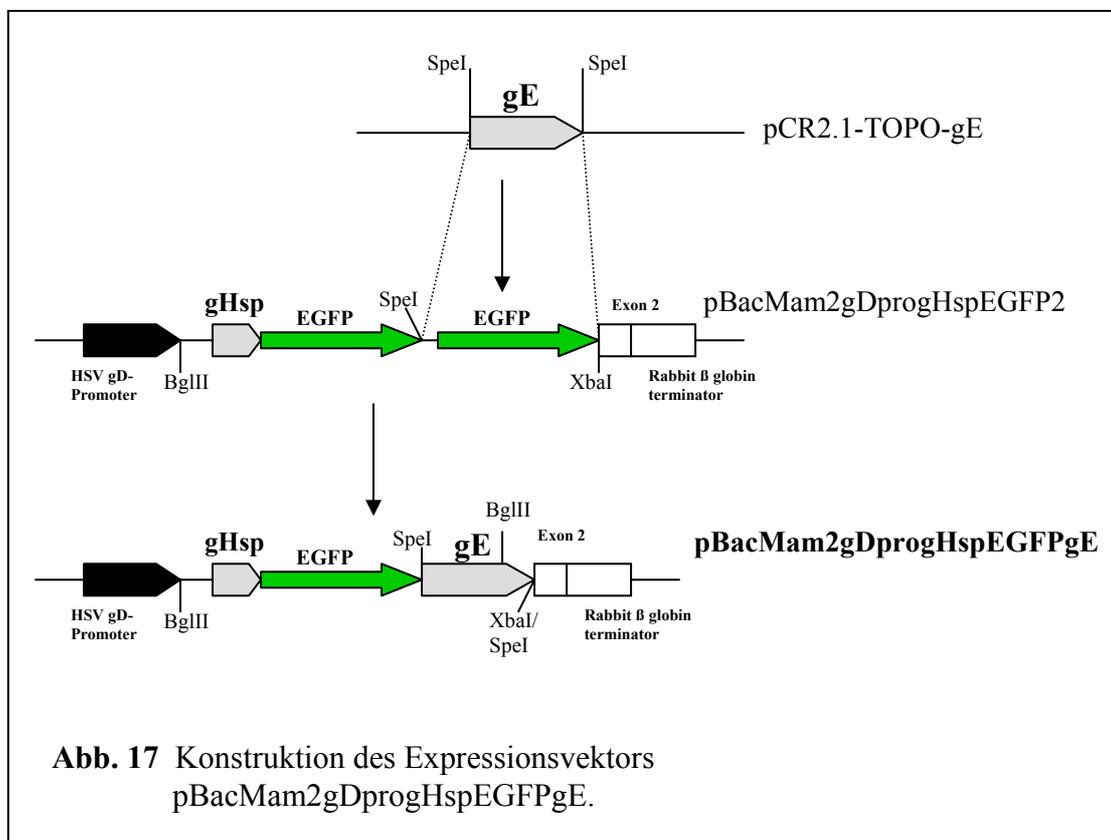
Im Gegensatz zu den C-terminal markierten UL35-, US9-, US11- und gL-Sequenzen wurde in Anlehnung an den von E. Lorentzen konstruierten Vektor pUCgHBgl2mEGFP (90) das EGFP direkt hinter der Signalpeptidsequenz am N-terminalen Ende der gE-Sequenz inseriert. Da die Signalpeptidsequenz des gE funktionell mit der des gH übereinstimmt und bereits EGFP-markiert aus pUCgHBgl2mEGFP übernommen werden konnte, wurde zur Herstellung des gE-Fusionsproteins die Signalpeptidsequenz von gH verwendet.

Die Klonierung von pBacMam2gDprogHspEGFPgE erfolgte in zwei Schritten. Zuerst wurde das EGFP-markierte Signalpeptid in pBacMam2gDproEGFP kloniert und anschließend die gE-Sequenz in das rekombinante Plasmid eingefügt.



Konstruktion von pBacMam2gDprogHspEGFP2

Das Fragment gHspEGFP wurde mit NcoI aus pUCgHBgl2mEGFP herausgeschnitten und mit dem Vektor pBacMam2gDproEGFP (Abb. 16), der durch das Enzym NcoI linearisiert und nachfolgend dephosphoryliert wurde, ligiert. Die pBacMam2gDprogHspEGFP2-Klone mussten auf korrekte Orientierung der Signalpeptidsequenz überprüft werden, was mit SpeI und SphI gelang. Richtig orientierte Insert-tragende Klone wurden für den nächsten Klonierungsschritt verwendet und auch zur Transfektion von Zellen benutzt.



Konstruktion von pBacMam2gDprogHspEGFPgE

Die mit SpeI-Schnittstellen flankierte und ohne Signalpeptidsequenz amplifizierte gE-Sequenz wurde in pCR2.1-TOPO ligiert und aus diesem Klonierungsvektor mit SpeI herausgeschnitten. Zielvektor für die Insertion der gE-Sequenz war der mit SpeI und

XbaI geöffnete und anschließend gezippte Vektor pBacMam2gDprogHspEGFP2 (Abb. 17). Die Restriktionsenzyme SpeI und XbaI erzeugen kompatible Basenüberhänge, wodurch eine Verknüpfung der Fragmente auf diesem Wege möglich, die XbaI-site im pBacMam2gDprogHspEGFPgE allerdings eliminiert wurde. Da das mit SpeI-Schnittstellen versehene Fragment gE beim Einsetzen in die Vektor-DNA eine beliebige Orientierung annehmen kann, musste diese anschließend getestet werden. Hierfür war das Enzym BglII ideal, da es sowohl in der Plasmid-DNA als auch im Bereich des C-terminalen Endes die gE-Sequenz einmal schneidet. Die Klone, die die erwarteten Fragment mit der entsprechenden Größe zeigten, wurden zur Expression des Fusionsproteins verwendet.

4.4 Charakterisierung der autofluoreszierenden Proteine mit Fluoreszenz-mikroskopie und Western-Blot

In den folgenden Abschnitten werden die einzelnen autofluoreszierenden Fusionsproteine durch die transiente Expression in Kulturzellen mit nachfolgender fluoreszenzmikroskopischer Analyse des Verteilungsmusters sowie Nachweis per Western-Blot charakterisiert. Die Transfektion von Vero- und HeLa-Zellen mit der Fusionsprotein-DNA erfolgte jeweils durch die Lipofektionsmethode. Die Zellen wurden mit dem HSV-1-Stamm17syn+ infiziert, dann in der Regel 12-16h bei 37°C inkubiert und im Anschluss der Fluoreszenzmikroskopie oder der Western-Blot-Analyse unterzogen. Für die fluoreszenzmikroskopische Analyse erfolgte die Fixierung der Zellen, das Überführen auf Objektträger und dann die Betrachtung unter dem Mikroskop mit speziellen Filtern. Für den Western-Blot wurden die transfizierten und infizierten Zellen geerntet und lysiert. Nach Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht mit Hilfe der Polyacrylamidgelelektrophorese und Transfer auf eine PVDF-Membran waren die exprimierten Fusionsproteine der Detektion durch spezifische Antikörper gegen GFP bzw. DsRed zugänglich.

4.4.1 Expressionsvektoren

Die Vektoren pBacMam2gDproEGFP, pBacMam2gDproECFP und pBacMam2gDproEYFP konnten erfolgreich in Kulturzellen exprimiert werden und wiesen dabei ein homogenes, unspezifisches Fluoreszenzmuster auf. Der Nachweis der Expression in infizierten Zellen wurde im Western-Blot mit dem GFP-Antikörper erzielt, der nach Inkubation mit dem entsprechenden Zweit-Antikörper und Entwicklung mit der Substratlösung die Banden im Bereich von 35kDa sichtbar machte (Abb. 18).

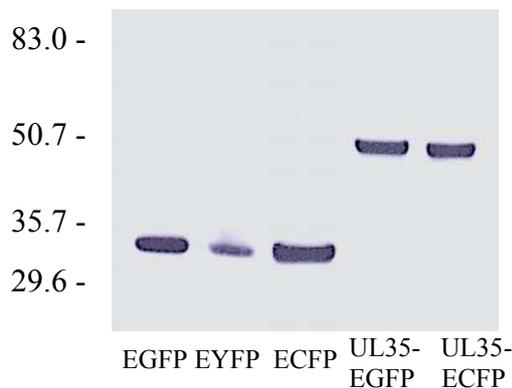
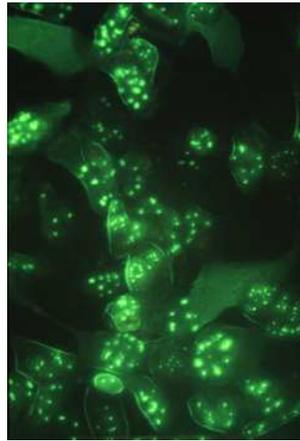


Abb. 18

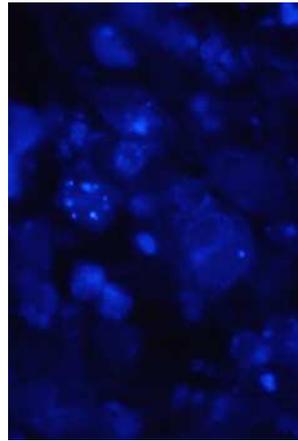
Nachweis der Expression von EGFP, EYFP, ECFP, UL35-EGFP und UL35-ECFP per Western-Blot.

4.4.2 Kapsidprotein UL35EGFP und UL35ECFP

Die Konstruktion und Expression von pBacMam2gDproUL35EGFP und pBacMam2gDproUL35ECFP lieferte ein Protein, das mit dem GFP-Antikörper als ca. 50kDa-Bande im Western-Blot detektierbar war (Abb. 18). Auch die Beobachtung der fluoreszierenden Proteine mit den entsprechenden Einfachbandfiltern für GFP bzw. EGFP und ECFP unter dem Mikroskop gelang. Es zeigte sich ein für das UL35-Protein charakteristisches intrazelluläres Muster. Die Abbildung 19 lässt neben einer homogenen zytoplasmatischen und nukleoplasmatischen Verteilung eine Fokussierung des UL35EGFP-Proteins in intranukleäre Punkte als Ort der Kapsidbildung erkennen. Das blau fluoreszierende UL35-Protein führte zu einem vergleichbaren intrazellulären Verteilungsmuster.



UL35EGFP

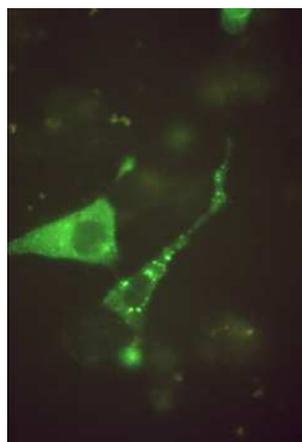


UL35ECFP

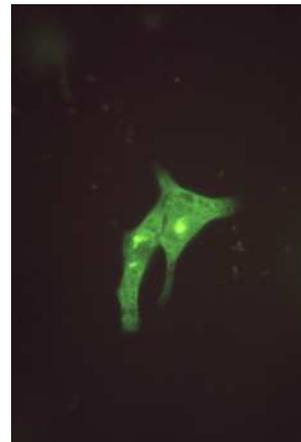
Abb. 19 Expression der Fusionsproteine UL35EGFP und UL35ECFP in Kulturzellen.

4.4.3 Tegumentproteine US9EYFP und US11EYFP

Die Transfektion von Zellen mit den Expressionsvektoren pBacMam2gDproUS9EYFP und pBacMam2gDproUS11EYFP führte zur Expression intensiv fluoreszierender Proteine. Das US9-Protein verteilte sich unter Aussparung des Nukleus homogen in der Zelle und akkumulierte stellenweise im Zytoplasma, möglicherweise in Proteasomen, den Orten der Ubiquitinylierung.



US9EYFP



US11EYFP

Abb. 20 Intrazelluläres Verteilungsmuster von US9EYFP und US11EYFP.

Das Fluoreszenzverhalten des US11-Proteins richtete sich vermutlich nach der Lokalisation der Ribosomen, so dass sich die gelbe Fluoreszenz sowohl im Nukleus in Konglomeraten konzentrierte als auch im Zytoplasma verteilte.

Beide Tegumentproteine waren im Western-Blot mit dem monoklonalen GFP-Antikörper nachzuweisen, das US9EYFP-Protein als eine Bande in der Nähe der 50kDa-Markierung und das US11EYFP-Protein im Bereich von 60kDa.

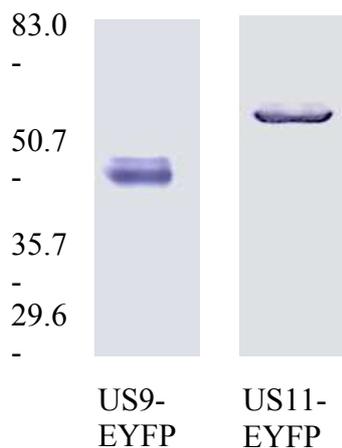


Abb. 21

Nachweis der zellulären Expression von US9EYFP und US11EYFP im Western-Blot.

4.4.4 Glykoproteine gLDsRed und gHspEGFPgE

Das Glykoprotein gL wurde mit dem rot fluoreszierenden DsRed1 markiert und in Vero-Zellen exprimiert. Das gLDsRed erzeugte ein ausschließlich zytoplasmatisches Fluoreszenzmuster, welches mit der TGN-Lokalisation vereinbar ist. Diese Beobachtung findet Übereinstimmung mit der Funktion von Hüllglykoproteinen innerhalb des replikativen Zyklus.

Auch der Nachweis der Expression in infizierten Zellen per Western-Blot war erfolgreich. Die Transfektion mit pBacMam2gDproDsRed führte zur zellulären Expression des DsRed-Proteins mit homogener Verteilung und konnte mit dem DsRed-Antikörper sichtbar gemacht werden. Die Fusion des Glykoproteins gL mit dem DsRed-Molekül erzeugte ein Protein mit einem ca. 40kDa größeren Molekulargewicht (Abb. 22).

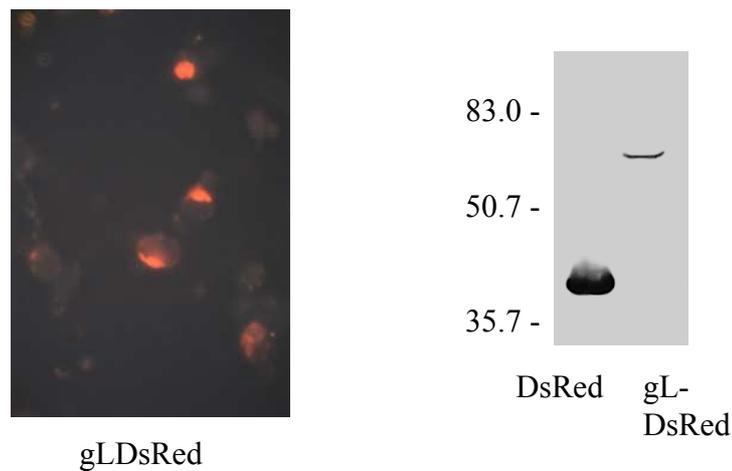


Abb. 22 Transiente Expression des Fusionsproteins gLDsRed und Nachweis von DsRed und gLDsRed im Western-Blot.

Ergänzend wurden in HeLa-Zellen von E. Lorentzen in der Arbeitsgruppe parallel zur gLDsRed-Transfektion subzelluläre Strukturen mit Markerproteinen versehen. Für die Darstellung des Golgi-Apparates wurde ECFP und für die Darstellung von Aktinfilamenten EYFP verwendet. Nach Koftransfektion von Zellen mit pECFP-Golgi, pEYFP-Aktin und pDsRed-N1-gL konnten die markierten Proteine und zellulären Komponenten unter dem speziellen Dreifachbandfilter simultan betrachtet werden (Abb. 23).

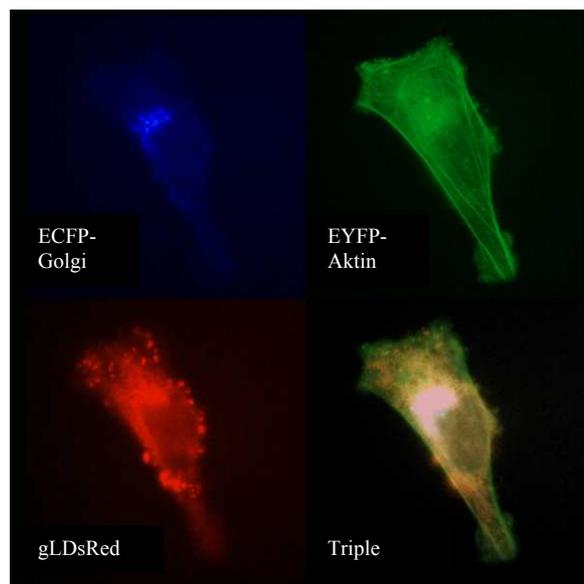


Abb. 23 Markierung des Golgi-Apparates mit ECFP, der Aktinfilamente mit EYFP und Expression von gLDsRed in HeLa-Zellen. Simultane Betrachtung (Triple) unter einem Dreifachbandfilter.

Das gLDsRed-Protein hielt sich auch hier in der TGN-Region auf. Diese Lokalisation wurde mit der ECFP-Markierung bestätigt. Ebenso ergab ein Vergleich der gL-Lokalisation mit den Aktinmarkierungen Hinweise auf eine Assoziation von gL mit den Aktinfilamenten.

Mit dem Vektor pBacMam2gDprogHspEGFPgE sollte das intrazelluläre Verhalten des Glykoproteins gE untersucht werden. Das grün fluoreszierende gE wies, wie erwartet für ein Glykoprotein, eine zytoplasmatische Verteilung auf. Diese Fluoreszenz verdichtete sich punktuell im perinukleären Areal. Dieses Verteilungsmuster spricht für eine gE-Lokalisation im TGN.

In der Western-Blot-Analyse wies das Fusionsprotein aus dem 80kDa großen gE-Protein und EGFP ein Molekulargewicht von ca. 120kDa auf (Abb. 24).

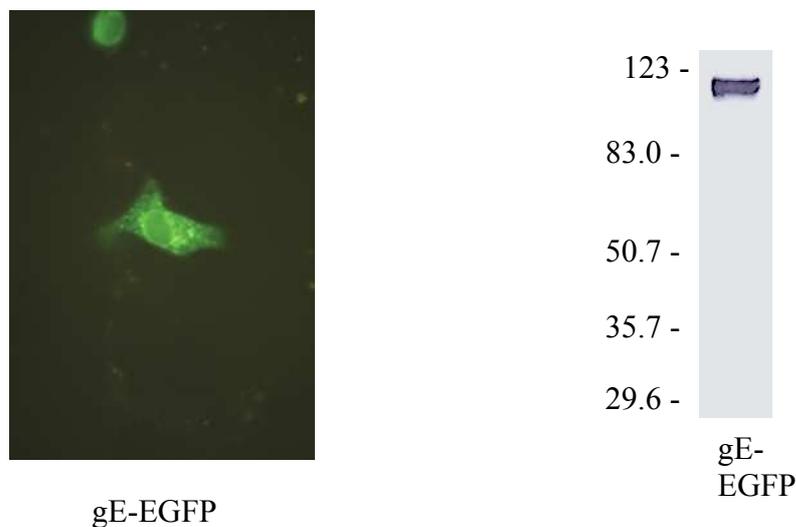


Abb. 24 Fluoreszenzmikroskopische Analyse des gE-Verteilungsmusters und Nachweis des gE-EGFP-Proteins im Western-Blot.

4.4.5 Simultane Expression von Virusproteinen

Durch die vorangegangenen Klonierungen konnten Virusproteine aus jeder der 3 Klassen von Strukturkomponenten (Hülle, Tegument, Kapsid) des HSV-1-Virus mit verschiedenfarbigen Fluoreszenzproteinen markiert werden. Es standen nun zahlreiche Fusionsproteine zur Verfügung, die uns auf die Idee brachten, Kulturzellen parallel mit unterschiedlichen Proteinen zu transfizieren. Es wurden verschiedene Zweifach- wie auch Dreifachkombinationen ausprobiert. Diese Transfektionen wurden mit der Lipofektionsmethode durchgeführt. Bei den Single-Transfektionen bestand ein Ansatz aus ca. 0,5µg Vektor-DNA mit 3µl Lipofektamin. Bei den Doppel- und Dreifach-Transfektionen wurde bei gleichbleibendem Lipofektaminvolumen von jeder Vektor-DNA ca. 0,5µg hinzugefügt. Nach der Transfektion erfolgte die Infektion mit dem HSV-1 syn17+ mit einer MOI von 5. Nach einer durchschnittlichen Inkubation von 12-16h bei 37°C wurde die Expression der Fusionsproteine fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

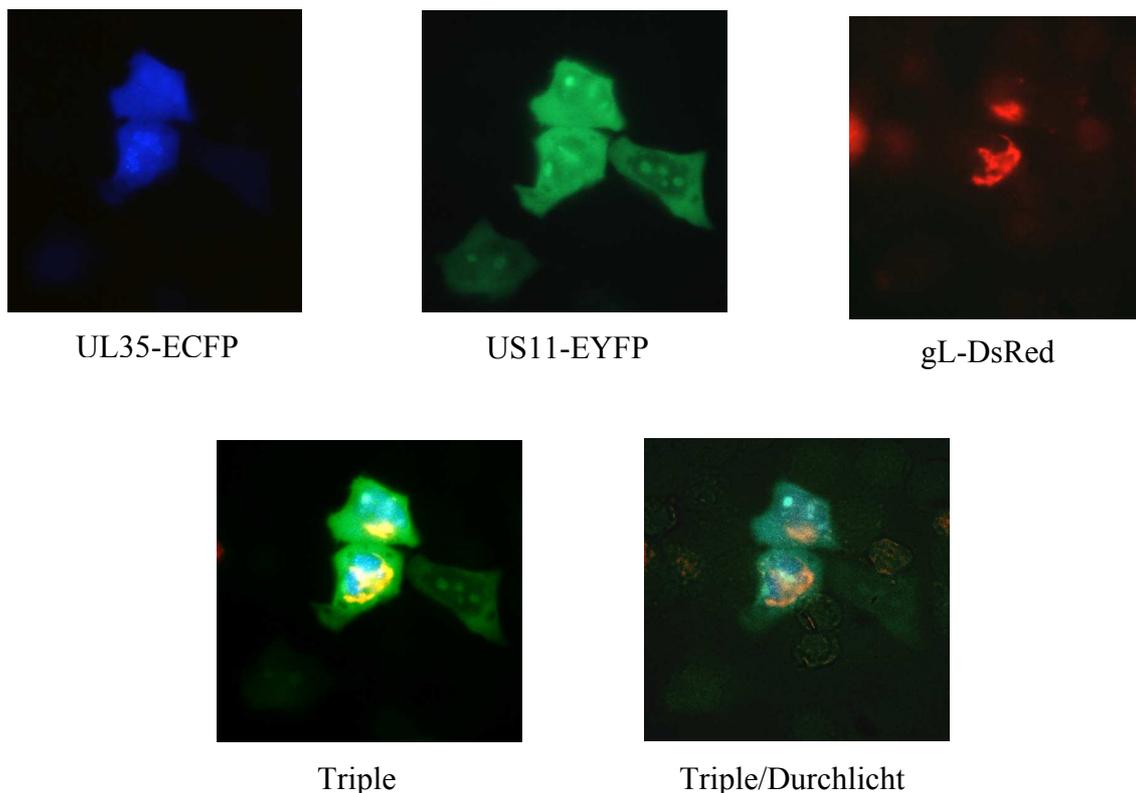


Abb. 25 Co-Expression von UL35ECFP, US11EYFP und gLDsRed in einer Zelle. Fluoreszenzmikroskopische Analyse mit Singlebandfilter und mit speziellen Triplebandfilter.

In den zahlreichen Versuchen erwiesen sich die simultanen Expressionen als erfolgreich. Unter dem Fluoreszenzmikroskop ließen die jeweiligen Virusproteine bei der Betrachtung mit Einfachbandfiltern die charakteristischen, intrazellulären Verteilungen erkennen. Die Beobachtung des Verteilungsmusters mit Hilfe eines speziellen Dreifachbandfilters zeigte die parallele Expression in einer Kulturzelle mit den typischen intrazellulären Lokalisationen von 2 bzw. 3 verschiedenen fluoreszierenden Proteinen. Die eindrucksvollsten Ergebnisse bzw. auch Photodokumentationen lieferte die Co-Expression von gLDsRed, US11EYFP und VP26ECFP.

Anhand der Abb. 25 ist zu erkennen, dass das UL35-Protein die nukleo- und zytoplasmatische Verteilung mit nukleären Foci behält, das US11-Protein intranukleäre Konglomerate und ein homogenes zytoplasmatisches Muster aufweist und auch das gL-Protein die zytoplasmatische, dem TGN entsprechende Lokalisation aufrechterhält. Die Betrachtung unter den speziellen Triplebandfiltern ermöglicht die simultane Analyse der co-exprimierten Virusproteine in einer Zelle. Hier kommen dann auch die charakteristischen Verteilungsmuster der einzelnen Virusproteine UL35, US11 und gL zum Ausdruck.

5. Diskussion

Zahlreiche veröffentlichte Forschungsergebnisse über die Funktion, die Expression und den intrazellulären Transport von Herpes simplex-Virus Typ 1-Proteinen sowie deren Interaktion mit zellulären Komponenten liefern wichtige Informationen über den Ablauf der HSV-1-Infektion. Eine vollständige Klärung bleibt jedoch noch aus. Diese noch nicht erforschten Details der viralen Infektion erstrecken sich ebenso auf das Zusammenfügen der Viruskomponenten zu einem Partikel und die Virusausschleusung. Nach dem derzeitigen Stand folgt nach dem Kapsidzusammenbau im Nukleus das Aussprossen der Virionen über die innere nukleäre Membran in den Perinuklearraum (39, 99). Der weitere Weg der Partikelwanderung wird in 2 Modellen kontrovers diskutiert.

Nach Johnson und Spear (79) ist diese innere Kernmembran die endgültige Virushüllmembran, in der die zunächst unreifen Glykoproteine während des vesikulären Transportes im Golgi-Kompartiment prozessiert werden. Die umhüllten Virionen erreichen über das ER und den Golgi-Apparat die Plasmamembran und werden dort aus der Zelle geschleust. Dies bedeutet, dass perinukleäre Virionen den vollen Satz der für HSV-1 charakteristischen Tegument- und Hüllglykoproteine tragen. Diese Theorie findet durch die Interpretation der Resultate von Campadelli-Fiume Bestätigung (26). Auch die Studie von Torrisi (144) unterstützt teilweise das Johnson&Spear-Modell.

Demgegenüber präsentierte Stackpole (138) ein Deenvelopment-reenvelopment-Modell, in dem an der äußeren Kernmembran nackte Nukleokapside entlassen und durch die von den Golgi-Zisternen abgeschnürten bilamellären Vesikeln umschlossen werden. Die innere Membran dieser Vesikel stellt die Virushülle nach Ausschleusung in den Extrazellulärraum dar und besitzt die im Golgi-Apparat prozessierten Glykoproteine. In diesem Fall findet die Assoziierung von Tegumentproteinen und der Virushülle in zytoplasmatischen Kompartimenten statt. Verschiedene Arbeiten, auch neueren Datums, unterstützen das Modell von Stackpole. Virusmutanten, die gD oder gH im ER zurückhalten, zeigten in den Nachkommenviren einen Verlust dieser Glykoproteine. Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass das Virus seine finale Hülle von einem post-ER-Kompartiment erhält (22, 135, 157). Ebenso konnten elektronenmikroskopische Studien das Modell für verschiedene Alphaherpesviren dokumentieren, u.a. auch für HSV-1 (69). Desweiteren wurde von van Genderen und Kollegen bewiesen, dass die

Phospholipidzusammensetzung der extrazellulären Virionen nicht mit der nukleären Membran übereinstimmt. Die Lipide der Virusmembran sind typischerweise im Golgi-Apparat und der Plasmamembran angereichert (148). Eine weitere Veröffentlichung zeigte, dass in lebenden, virusinfizierten Zellen die mit GFP markierte Haupttegumentkomponente VP22 anscheinend ausschließlich im Zytoplasma vorhanden ist (56). Zusätzlich unterstützen Untersuchungen in Nervenzellen den Deenvelopment-reenvelopment-Weg und zeigen, dass Nukleokapside und Glykoproteine nach separatem Transport erst in den Axonenden zusammengefügt werden. Die nichtumhüllten Nukleokapside werden direkt von der Kernmembran zu den Mikrotubuli und die Glykoproteine via Golgi-Apparat ins terminale Axon transportiert (9, 57, 110).

Die Untersuchung räumlicher und zeitlicher Transport- und Ausbreitungsmuster von HSV-Typ-1- Proteinen und der Bildung des Viruspartikels ist auch übergeordnetes Ziel unseres Forschungsprojektes. Hierzu werden autofluoreszierende Fusionsproteine konstruiert und in intakten Zielzellen teilweise mit simultaner autofluoreszierender Markierung subzellulärer Organellen per Fluoreszenzmikroskopie und konfokaler Lasermikroskopie analysiert. Als Teil dieses Forschungsprojektes war das Ziel dieser Doktorarbeit die Konstruktion von autofluoreszierenden Fusionsproteinen, deren transiente Expression in intakten Zielzellen und die fluoreszenzmikroskopische Analyse der intrazellulären Verteilung. Es wurden Strukturproteine der 3 Viruskomponenten ausgewählt, das Kapsidprotein VP26, die Tegumentproteine US9 und US11 sowie die Hüllglykoproteine gL und gE. Der ebenfalls im Rahmen des übergeordneten Forschungsprojektes von A. Heid hergestellte Vektor pBacMam2gDproEGFP diente dabei als Transfer- und Expressionsvektor. Zwei *multiple cloning sites* umgeben die EGFP-kodierende Sequenz und ermöglichen die C-terminale oder N-terminale Verknüpfung der viralen Proteine mit EGFP. Zur simultanen Darstellung von Kapsid-, Tegument- und Hüllproteinen mussten verschiedenfarbig autofluoreszierende Fusionsproteine zur Verfügung stehen. Daher wurden einige der ausgewählten Virusproteine mit den anderen Fluoreszenzmarkern ECFP, EYFP oder DsRed fusioniert.

5.1 Expression und Verteilungsmuster des Kapsidproteins UL35

VP26, Produkt des Leserahmens UL35, ist das kleinste der bekannten Kapsidproteine und befindet sich an der Oberfläche der Kapsidstruktur an den Spitzen der VP5-Hexamere. Hierbei ordnen sich jeweils 6 VP26-Moleküle um ein VP5-Protein. Die exponierte Lokalisation an der Kapsidaußenfläche regte Desai und Person zu der Überlegung an, dieses Polypeptid mit einem autofluoreszierenden Protein zu markieren. Die Inkorporation des Fusionsproteins in die Kapsidstruktur sollte das Nukleokapsid kennzeichnen und die Möglichkeit eröffnen, die Bildung und den intrazellulären Transport des Nukleokapsids sowie die Ausschleusung reifer Viren zu visualisieren. Im Jahr 1998 gelang Desai die Konstruktion des Fusionsproteins VP26GFP, die nachfolgende Expression in Vero-Zellen und erstmals auch durch den Einbau von EGFP ins Kapsid die fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Viruspartikel-ausschleusung. Die strukturelle Aktivität des VP26-GFP-Fusionsproteins und die biologische Aktivität der infektiösen Nachkommenviren waren vergleichbar mit derjenigen des wt-VP26-Proteins (43).

In Anlehnung an die Forschungsergebnisse von Desai konstruierten wir den Vektor pBacMam2gDproUL35EGFP, der in Säugierzellen zur Expression des autofluoreszierenden UL35-EGFP-Fusionsproteins führen sollte. Im Gegensatz zu dem VP26GFP von Desai et al. wurde die DNA-Sequenz UL35 am 5'-Ende der EGFP-Sequenz in den Zielvektor inseriert. In HSV-1-überinfizierten Säugierzellen konnte das Fusionsprotein exprimiert werden und zeigte mit einem punktuellen, nukleären Fluoreszenzmuster sowie einer zusätzlichen homogenen Fluoreszenz im Kern wie auch im Zytoplasma ein räumliches Verteilungsmuster, das weitgehend im Einklang stand mit den publizierten Daten von Desai et al.. Diese Übereinstimmungen bezogen sich auch auf die zeitliche Änderung des intrazellulären Verteilungsmusters des UL35EGFPs, die in den Versuchen von A. Heid (Doktorarbeit) dokumentiert wurden. Früh nach der Infektion entstand eine homogene nukleäre und zytoplasmatische Fluoreszenz, gefolgt von einer zusätzlichen Ausbildung eines punktierten, intranukleären Musters mit zunehmender Intensität und im weiteren Verlauf eine ausgeprägte Fluoreszenz im Zytoplasma mit Konzentration im Bereich der Zellmembran. Die Lokalisation der intranukleären Foci korrespondiert mit den Orten

der Kapsidbildung und reflektiert die Akkumulation des UL35 und somit den Zeitpunkt zu dem es durch die Interaktion mit VP5 und einem weiteren Protein, VP19c oder preVP22a (117), in die Kapsidstruktur eingebaut wird. Die zunehmende zytoplasmatische Fluoreszenzintensität spiegelt den Transport des Nukleokapsids bzw. der Virionen durch das Zytoplasma zur Zellmembran wieder, wo sich letztendlich die Viruspartikel ansammeln und ausgeschleust werden.

Entsprechend den übereinstimmenden Ergebnissen scheint die Position des UL35 innerhalb des Fusionsproteins, ob N-terminal oder C-terminal zum EGFP, keine sichtbaren Auswirkungen auf die Expression und das Fluoreszenzverhalten zu haben. Ebenso blieb ein Austausch des EGFP durch das ECFP innerhalb des Fusionsproteins ohne Einfluss auf die räumliche und zeitliche Ausbreitung des Fluoreszenzmusters. Der Vektor pBacMam2gDproUL35ECFP wurde konstruiert, um die Dokumentation einer simultanen Expression mit Tegument- und Hüllproteinen zu ermöglichen. In den Versuchen konnten mit UL35ECFP vergleichbare Daten erhoben werden wie mit UL35EGFP.

Die Aufgaben des VP26 sind unklar. Eine signifikante Funktion in der strukturellen Stabilisierung des Kapsids konnte bereits ausgeschlossen werden (14, 145). Das VP26 ist zwar ein kleines, jedoch ein in hoher Anzahl an der Kapsidoberfläche vorkommendes Protein. Diese Lokalisation kann für eine Rolle des VP26 in der Interaktion mit Tegumentproteinen und der Verankerung der Tegumentmatrix an das Kapsid spielen. Eine Funktion im intrazellulären Nukleokapsidtransport wäre denkbar, ist aber in Nervenzellen schon für unwahrscheinlich erklärt worden (44).

5.2 Expression und Verteilung des Fluoreszenzmusters von US9

Das US9 ist ein unter den Alphaherpesviren hochkonserviertes Protein, besitzt jedoch in den Partikeln der verschiedenen Herpesviren unterschiedliche Positionen. Während es im Herpes simplex-Virus Typ1 mit noch nicht geklärter Funktion einen Platz im Tegument einnimmt (61), wurde es im PRV und CMV als TypII-Membranprotein charakterisiert und als Protein mit wichtigen Funktionen in der Zell-zu-Zell-Ausbreitung in polarisierten Zellen und in der axonalen Lokalisation von

Virusmembranproteinen identifiziert (17, 92). Im HSV-1 wird das kleine Tegumentprotein US9 während des Replikationszyklus ubiquitinyliert. Da es seine Stabilität unter dieser Ubiquitinylierung beibehält, wird dem US9 eine Rolle in der Blockade des Abbaus von spezifischen Proteinen zugedacht (15).

Im Hinblick auf die intrazelluläre Verteilung des US9 wurden korrelierend zu den verschiedenen Charakterisierungen unter den einzelnen Herpesviren voneinander abweichende Lokalisationen beschrieben. Als typisches Membranprotein sollte PRV- und CMV-US9 im Golgi-Apparat lokalisiert sein. Brideau und Kollegen (17) sowie Tomishima und Enquist (143) bestätigten diese Lokalisation für PRV US9 und konnten mit der Interpretation ihrer Ergebnisse das Deenvelopment-reenvelopment-Modell unterstützen. Für HSV-1 existieren Daten, die das Vorhandensein des US9-Proteins im Nukleus beweisen. Frame und Mitarbeiter entdeckten US9 zum Zeitpunkt der Nukleokapsidformation im Kern von infizierten Zellen (61). Im Jahr 1997 konnte Brandimarti die Ubiquitinylierung von US9 und die Assoziation mit Proteasomen durch Immunpräzipitationsanalysen sichern (15). Die zytoplasmatische und nukleäre Lokalisation der Proteasomen wäre somit möglicherweise auch auf die intrazelluläre US9-Verteilung übertragbar.

Eine etwas aktuellere Studie von Miranda-Saksena und Kollegen befasst sich mit der Lokalisation von verschiedenen HSV-1-Tegumentproteinen, u.a. US9 und 2 HSV-1-Glykoproteinen (100). Elektronenmikroskopisch konnten die mit Antikörper versehenen Tegumentproteine im Nukleus detektiert werden. Die Aufgaben der Proteine wären daher möglicherweise eher funktioneller Art, da ein großer Teil der aus dem Nukleus aussprossenden Nukleokapside nicht mit den genannten Tegumentproteinen assoziiert waren. Weitere Versuche mit Golgi-Markierungen und Brefeldin A zeigten dann, dass die freien Tegumentproteine mit dem Golgi-Apparat in Verbindung stehen und dass die sekundäre Umhüllung in zytoplasmatischen Kompartimenten abläuft als weiterer Beweis für das Modell von Stackpole. In unserer Arbeit sollte nun das HSV-1-US9 durch eine gelbe Fluoreszenz visualisiert werden. Mit Hilfe des Vektors pBacMam2gDproUS9EYFP konnten wir das Fusionsprotein US9EYFP erfolgreich in HSV-1-infizierten Zellen exprimieren. Die Fluoreszenz verteilte sich dabei im Zytoplasma unter Aussparung des Nukleus, zum Teil homogen, zum Teil gesprenkelt. Die von Frame beobachtete nukleäre Verteilung war in unseren Versuchen somit nicht

nachvollziehbar. Im Gegensatz dazu wäre die von Brandimarti beschriebene Assoziation mit Proteasomen denkbar. Die posttranslational ubiquitinylierten US9-Moleküle orientieren sich an den zytoplasmatischen Proteasomen und könnten so auf den zellulären Proteinabbau Einfluss nehmen, indem das US9-Protein z.B. den Abbau schädlicher Proteine fördert oder denjenigen von wichtigen Proteinen für den viralen Replikationsprozess verhindert bzw. hinauszögert. Zu diskutieren wäre hinsichtlich der zytoplasmatischen Präsenz und im Zusammenhang mit den Beobachtungen von Miranda-Saksena auch eine Assoziation mit dem Golgi-Apparat, dem TGN oder Golgi-Vesikel, zusammengefasst mit den Orten, an denen sich die Tegumentproteine mit den Nukelokapsiden verbinden und sich dann der endgültigen Umhüllung unterziehen. Letztendlich sind aus unseren fluoreszenzmikroskopischen Aufzeichnungen keine klaren Rückschlüsse auf die intrazelluläre Verteilung und Funktion zu ziehen. Weitere Analysen, z.B. die simultane Markierung subzellulärer Organellen, könnten sicherlich einen weiteren Aufschluss über das US9-Verhalten in der Zelle geben.

5.3 Expression und Verteilungsmuster des Tegumentproteins US11

Für unsere Arbeit wählten wir als Vertreter des HSV-1-Teguments das US11. Ein 21kDa grosses, in hoher Kopierzahl vorkommendes Protein, das erst in jüngerer Zeit in etlichen Studien in seiner intrazellulären Lokalisation und Funktion näher charakterisiert werden konnte. Das US11-Protein besitzt die Fähigkeit mit zahlreichen intrazellulären Molekülen in Interaktion zu treten und so auf eine vielfältige Art und Weise in die Prozesse des replikativen Zyklus einzugreifen. Als sequenz- und konformationsspezifisches RNA-Bindungsprotein mit regulatorischer Funktion wird das Protein spät im Infektionszyklus gebildet und bindet an die RNA der 60S-Ribosomenuntereinheit (114, 122, 124). Diese Information lässt vermuten, dass sich die intrazelluläre Lokalisation des US11 an der Verteilung der Ribosomen orientiert. So würde US11 zum einen im Zytoplasma zu finden sein und zum anderen im Nukleolus akkumulieren, dort wo Ribosomenbestandteile aufgebaut werden. Möglicherweise kann das US11-Protein gerade eben durch die enge Assoziation mit dem Ort der Proteinbiosynthese mit zellulären oder viralen Proteinen interagieren und auf deren

Funktion Einfluss nehmen. Zur Charakterisierung der intrazellulären Verteilung des US11-Proteins diente der Vektor pBacMam2gDproUS11EYFP. Das gelb fluoreszierende Fusionsprotein US11EYFP zeigte sowohl eine zytoplasmatische wie auch nukleäre Expression. Im Zytoplasma verteilte sich das Fusionsprotein relativ homogen, im Gegensatz dazu konzentrierte sich die Fluoreszenz im Kern auf die Nukleoli. Diese Ergebnisse finden Übereinstimmungen mit den Publikationen von Puvion-Dutilleul (114) oder auch Roller und Roizman (124), die in immunfluoreszenzmikroskopischen Arbeiten ebenfalls diese intrazelluläre US11-Lokalisation beobachteten. Neben der ribosomalen 60S-Untereinheit konnten bereits weitere Substrate der RNA-Bindungsdomäne identifiziert werden, die einen regulatorischen Einfluss von US11 in dem PKR-vermittelten Abbruch der Proteinsynthese im Rahmen der Infektion bewirken. Es konnte eine direkte Interaktion von US11 mit der wirtszelleigenen Proteinkinase R in Anwesenheit von RNA gesichert werden (30). Weiterhin verhindert das US11-Protein die PKR-Aktivierung über PACT (111).

Bezüglich des Aspektes der zellulären Ausschleusung viraler Komponenten ist die Wechselwirkung von US11 mit Bestandteilen des Zytoskeletts von Interesse. In der Literatur findet man Daten, die eine Interaktion zwischen US11 und den Kinesinmolekülen bestätigen. Diefenbach und Kollegen konnten 2003 eine direkte Interaktion von US11 mit der schweren Kinesinkette nachweisen (49). Ebenso besteht nach der Arbeit von Benboudjema et al. eine Verbindung über PACT1 mit der leichten Kinesinkette (11). Diese Fähigkeit an Zytoskelettmoleküle zu binden, kann möglicherweise eine wichtige Funktion für US11 bei dem intrazellulären Transport von viralen Molekülen bedeuten. Als Komponente des Tegumentes würde z.B. auch eine Funktion im Nukleokapsidtransport in Frage kommen. Die Beobachtung von Ward und Roizman, dass US11 sich in der Nähe von Assemblons aufhält (153), kann dafür sprechen, dass US11 z.B. über VP5 mit dem Nukleokapsid in Wechselwirkung tritt und dann über die Bindung an die schwere Kinesinkette für den anterograden axonalen Transport von Nukleokapsiden sorgt.

5.4 Expression und Verteilung des Fluoreszenzmusters von gL

Die Glykoproteine sind nützliche Werkzeuge in der Analyse des Ausschleusungsprozesses von HSV-1 aus infizierten Zellen. So konnten durch verschiedene Arbeiten mit Virusmutanten Rückschlüsse auf den Ort der endgültigen Virusumhüllung gezogen werden. Zum Beispiel konstruierten Whiteley und Kollegen eine Virusmutante, die gD im ER zurückhält. In der Folge war gD in den sezernierten, reifen Virionen nicht detektierbar (157). Eine vergleichbare Studie lieferten Browne et al mit einem im ER zurückgehaltenen Glykoprotein H, indem das Retentionssignal am Carboxyterminus durch Addition von 2 Aminosäuren verändert wurde (22). In den rekombinanten Viren wurden gH und gL nicht zu der reifen Form prozessiert, nicht auf der Zelloberfläche exprimiert und bewirkte dadurch eine 100fach geringere Infektiosität der Nachkommenviren. Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die endgültige Umhüllung in einem Post-ER-Kompartiment stattfindet, möglicherweise im Golgi-Komplex oder auch in vom Golgi-Apparat abstammenden Vesikeln. Da Glykoproteine im TGN prozessiert werden und sich dort vermutlich, eingefügt in einer vom TGN abstammenden Membran, um das Nukleokapsid und das Tegument schließen, wäre eine Anhäufung der mit einem Fluoreszenzmarker versehenen Glykoproteine im TGN zu erwarten.

Für unsere Arbeit wählten wir das Glykoprotein L aus, das mit gH einen stabilen Heterokomplex bildet. Eine gegenseitige Abhängigkeit besteht insofern, als einerseits gL für die korrekte Faltung und den intrazellulären Transport von gH notwendig ist und andererseits gH die Hüllmembranassoziation von gL ermöglicht. Zusammen sind sie essentiell für die Penetration und Infektiosität der HSV-1-Partikel. Das Glykoprotein L wird während des intrazellulären Transportes durch Addition von Zuckerresten im Golgi-Apparat von einer ca. 25kDa- zu einer reifen 40kDa-Form modifiziert (75).

Wir markierten das gL mit dem rot fluoreszierenden DsRed1-Protein und klonierten es zur Expression in den Vektor pBacMam2gDprogLDsRed1. In der fluoreszenzmikroskopischen Analyse zeigte sich eine zytoplasmatische Fluoreszenz unter Aussparung des Zellkernes und der Kernmembran, die sich zumindest in dem Verteilungsmuster nicht deutlich abgrenzte. Dagegen konzentrierte sich, wie zu erwarten, die Fluoreszenz auf ein Areal im Zytoplasma, das dem TGN entspricht. Dort

wo gL einer Prozessierung unterliegt und sich vermutlich in Anwesenheit von gH in die Hüllmembran einfügt. Eine weitere Intensitätszunahme der Fluoreszenz findet man an der Plasmamembran. Diese tritt punktförmig als Ausstülpung bzw. Anhangsgebilde in Erscheinung. Eine Interpretation dieser Beobachtung könnte so aussehen, dass die gL-DsRed1-Fusionsproteine nach Transport via Zytoskelett an der Zellperipherie akkumulieren und dann in den Extrazellulärraum sezerniert werden. Denkbar wäre auch ein Einbau des gLDsRed1 in die Zellmembran unter Komplexbildung mit gH. Davon ausgehend, dass das Fusionsprotein in reife Virionen inkorporiert wird, kann die punktuelle Fluoreszenz an der Zellmembran auch Ausdruck von Virionen sein, die kurz vor der Zellausschleusung durch *budding* stehen.

Interessant sind die Resultate der simultanen Darstellung von Zellorganellen und Komponenten des Zytoskeletts durch Fluoreszenzproteine. In der Arbeitsgruppe wurde von E. Lorentzen parallel zur Expression von gLDsRed1 der Golgi-Apparat mit ECFP und die Aktinfilamente mit EYFP markiert. Die simultane Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop mit dem FITC-Filter und die separate Darstellung mit Hilfe entsprechender Filter lassen deutliche Übereinstimmungen erkennen. Die Lokalisation des Golgi-Apparates entspricht derjenigen zytoplasmatischen Fluoreszenzansammlung in den gLDsRed1-exprimierenden Zellen. Die Visualisierung der Aktinfilamente durch EYFP zeigte eine flächige, zytoplasmatische Verteilung mit Konzentration dicht unter der Zellmembran. Dies kann Hinweis dafür sein, dass gL bzw. der gH/gL-Komplex oder reife Virionen u.a. über die Aktinfilamente zur Zellperipherie transportiert werden.

5.5 Expression und Verteilung des Fluoreszenzmusters von gE

Im Mittelpunkt unseres Interesses stand ein weiteres Glykoprotein, das gE. Es bildet mit gI einen stabilen Heterokomplex und übernimmt als Virusbestandteil in der Hülle wichtige Funktionen zum Schutz des Virions gegenüber der Immunabwehr des Wirtes und in der Zell-zu-Zell-Ausbreitung. Zur Charakterisierung des räumlichen Verteilungsmusters von gE konstruierten wir den Vektor pBacMam2gDprogHspEGFPgE. Aufgrund des von uns für die Klonierung gewählten Ausgangsvektors pUCgHBgl2mEGFP (90) erscheint die funktionell vergleichbare Signalpeptidsequenz

von gH anstelle der von gE und die EGFP-Sequenz am 5'-Ende der gE-DNA, so dass nach Abspalten der Signalpeptidsequenz das EGFP bei der Expression des Fusionsproteins eine N-terminale Position einnimmt. Wie zu erwarten fand sich bei der Expression in HSV-1-infizierten Vero-Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop eine zytoplasmatische Fluoreszenz mit punktuellen Verdichtungen im perinukleären Bereich, die charakteristisch ist für die TGN-Lokalisation. Dieses Fusionsprotein bot damit ein vergleichbares intrazelluläres Verteilungsmuster wie die immunfluoreszenzmikroskopischen Studien von Alconada und Kollegen (2) sowie McMillan und Johnson (96), die das gE mittels Antikörper detektierten. Zwei Sortiersignale in der zytoplasmatischen gE-Domäne sorgen für die Akkumulation des gE/gI-Komplexes im TGN, in dem die Glykoproteine posttranslational modifiziert werden. Ausgehend von einem Deenvelopment-reenvelopment-Modell kann das Auftreten von gE im Golgi-Komplex für den Prozess der Virusumhüllung von Bedeutung sein. Einen Hinweis für eine wichtige Funktion bei diesem Vorgang konnte die im Jahr 2003 veröffentlichte Arbeit von Farnsworth und Kollegen geben, die das Verhalten von gD-/gE-Doppel- und gD-/gE-/gI-Dreifachdeletionsmutanten unter dem Elektronenmikroskop betrachteten (58). Der kombinierte Verlust von gD und gE löste eine deutliche zytoplasmatische Akkumulation von nicht-umhüllten Nukleokapsiden aus. Noch deutlicher fiel dieser Effekt bei einer Dreifachdeletion gD/gE/gI aus. Diese Beobachtung lässt einen Rückschluss auf eine essentielle Funktion des gE/gI-Komplexes im Zusammenwirken mit gD bei der zytoplasmatischen Umhüllung zu, vermutlich durch Interaktion von Tegument-umhüllten Nukleokapsiden mit der zytoplasmatischen Domäne von den HSV-1-Glykoproteinen, die sich im TGN oder Endosomen ansammeln.

Eine weitere wichtige Funktion wird dem gE/gI-Komplex in der Zell-zu-Zell-Ausbreitung zugeschrieben. McMillan und Johnson beschrieben in ihrer Publikation nach der frühen perinukleären Lokalisation zusätzlich noch eine Orientierung von gE/gI an die laterale Zelloberfläche in der späten Phase des Infektionszyklus. Erklärt wird dieses Phänomen durch die Bindung eines Areals der intrazytoplasmatischen gE/gI-Domäne an den zellulären AP-1-Clathrin-Adapter-Komplex, durch die die Virionen zu den Zellverbindungen transportiert werden und dort mit der extrazellulären gE/gI-Domäne mit zellulären Liganden in Interaktion treten (96). Diese Beobachtung erfolgte allerdings in polarisierten Zellen, die ausgedehnte Zellverbindungen besitzen. In

unseren Versuchen mit Vero- und HeLa-Zellen konnten wir daher keine Akkumulation der Fluoreszenz an der Zellmembran finden und somit Hinweise auf eine Einwirkung auf die Zell-zu-Zell-Ausbreitung nicht beobachten.

5.6 Die simultane Expression von verschiedenen autofluoreszierenden Virusproteinen

Das Ziel der vorausgegangenen Versuche war es, expressionskompetente, autofluoreszierende Proteine zu konstruieren, die eine Darstellung der intrazellulären Ausbreitungen und somit Rückschlüsse auf den Transport der ausgewählten Virusproteine ermöglichen. Die Fusionsproteine UL35EGFP, UL35ECFP, US9EYFP, US11EYFP, EGFPgE und gLDsRed erfüllten diese Zielsetzung. Die Tatsache, dass eine erfolgreiche Expression in Kulturzellen gelang und die intrazelluläre Verteilung sowohl weitgehend charakteristisch war für die Lokalisation innerhalb der Virusstruktur als auch mit in der Literatur publizierten Daten korrelierte, sprechen gegen schwerwiegende Fehler bei der Replikation und Translation der kodierenden Sequenzen. Es standen nun verschiedenfarbige fluoreszierende und zur Expression fähige Virusproteine der drei HSV-1-Strukturkomponenten Hülle, Tegument und Kapsid zur Verfügung. Daraufhin stellte sich die Frage, ob eine simultane Infektion und Expression der Fusionsproteine in einer Zelle möglich sein würde. In der Literatur existierten bislang keine Veröffentlichungen, die diese Thematik behandelten und Vergleiche zuließen. Schließlich folgte eine Reihe von Versuchen, in denen die gleichzeitige Transfektion von Zellen mit zwei oder drei verschiedenen Fusionsproteinen und die anschließende HSV-1-Infektion getestet werden sollte. Die Koexpression von UL35ECFP mit gLDsRed sowie von UL35ECFP mit US11EYFP und gLDsRed lieferten die eindrucksvollsten Resultate. Fluoreszenzmikroskopfilter mit den spezifischen Exzitations- und Emissionsmaxima für die autofluoreszierenden Proteine ermöglichten eine separate Visualisierung der intrazellulären Lokalisation der jeweiligen Virusproteine. Die Proteinverteilungen waren vergleichbar mit denjenigen, die in den vorangegangenen Einzelexpressionen dokumentiert wurden. Für das Glykoprotein L war es die dem TGN entsprechende Konzentrationen der roten Fluoreszenz im Zytoplasma. Das US11EYFP akkumulierte in den Nukleoli und im

Zytoplasma und das blau fluoreszierende UL35 zeigte ein punktuell, nukleäres Verteilungsmuster. Die parallele Betrachtung der Fusionsproteine in der Zelle erlaubte ein eigens für diesen Zweck hergestellter Dreifachbandfilter von der Firma AHF. Die Fluoreszenzmuster ließen die bekannten intrazellulären Lokalisationen erkennen. So ergaben die separaten wie die simultanen zellulären Expressionen der Virusproteine vergleichbare Ergebnisse. Anhand dieser Betrachtungen lässt sich vermuten, dass eine bedeutende gegenseitige Beeinträchtigung der autofluoreszierenden Virusproteine in der intrazellulären Ausbreitung unwahrscheinlich ist bzw. zumindest ohne größere Auswirkungen bleibt. So bietet die simultane Expression verschiedener Virusproteine prinzipiell die Möglichkeit, den Transport der Proteine, speziell auch deren Interaktionen sowie deren Rolle in der intakten, virusinfizierten Wirtszelle direkt darzustellen und zu analysieren.

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Analyse des intrazellulären Verteilungsmusters von verschiedenen Proteinen des HSV-1, die Rückschlüsse auf die Proteinfunktion innerhalb des replikativen Zyklus wie auch auf den intrazellulären Transport von Nachkommenviren ermöglichte. Im Mittelpunkt des Interesses standen das Kapsidprotein UL35, die Tegumentproteine US9 und US11 sowie die Hüllglykoproteine gE und gL. Als Transfer- und Expressionsvektor wurde pBacMam2gDproEGFP verwendet, der eine hocheffiziente, HSV-spezifische Genexpression bietet und die Virusproteine mit dem autofluoreszierenden Protein EGFP markiert. Durch weitere Zwischenklonierungsschritte konnten die unterschiedlichen Virusproteine mit weiteren andersfarbigen Autofluoreszenzproteinen fusioniert und mittels pBacMam2gDpro in die Zellen übertragen und exprimiert werden. Im Anschluss wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop die intrazelluläre Verteilung der autofluoreszierenden Virusproteine beobachtet und dokumentiert. Für alle ausgewählten Virusproteine gelang die Konstruktion eines autofluoreszierenden Fusionsproteins, die separate Expression in Säugerzellen wie auch die simultane Expression verschiedener Virusproteine in einer Zelle.

Das kleinste der bekannten HSV-1-Kapside, das UL35, wurde mit EGFP sowie ECFP fusioniert und zeigte in beiden Fällen eine punktierte, intranukleäre Fluoreszenz und im weiteren Verlauf eine zytoplasmatische Verteilung mit Konzentration an der Zellmembran. Das UL35-Protein akkumuliert an den Orten der Kapsidbildung und trägt vermutlich eher eine funktionelle Aufgabe, indem es mit Tegumentproteinen interagiert. Die beiden Tegumentproteine US9 und US11 wurden mit EYFP markiert. Das US9EYFP zeigt eine zum Teil homogene und zum Teil gesprenkelte zytoplasmatische Verteilung, die eine Assoziation mit Proteasomen vermuten lässt. Das vielseitig mit intrazellulären Molekülen in Interaktion tretende US11-Protein wurde mittels EYFP im Zytoplasma wie auch in den Nucleoli detektiert. Es orientiert sich an der Verteilung von Ribosomen bzw. Ribosomenbestandteilen und steht damit in Assoziation mit dem Ort der Proteinbiosynthese. Das grün fluoreszierende gHspEGFPgE und das rot fluoreszierende gLDsRed zeigten die für Glykoproteine typische Lokalisation im TGN. Die Glykoproteine werden dort prozessiert, fügen sich in die endgültige Virushüllmembran ein und umschließen mit dieser dann das Kapsid und Tegument.

Versuche, in denen subzelluläre Organellen mit Markerproteinen versehen wurden, bestätigen die gL-Lokalisation im TGN.

Erfolgreiche Expressionen konnten auch bei der simultanen Transfektion einer Zelle mit Kapsid-, Tegument- und Hüllproteinen beobachtet werden, die bis dato in der Literatur noch nicht beschrieben worden waren. Bei der fluoreszenzmikroskopischen Analyse zeigte sich weder bei der Expression noch bei der intrazellulären Lokalisation der einzelnen Virusproteine eine gegenseitige Beeinträchtigung. Die intrazellulären Verteilungsmuster waren vergleichbar mit derjenigen der separaten Expression. Die Co-Expression viraler Proteine oder auch die gleichzeitige Markierung zellulärer sowie viraler Proteine und subzellulärer Strukturen bietet die Möglichkeit, parallele Abläufe und Interaktionen innerhalb des Replikationszyklus zu beobachten und zu analysieren.

7. Literaturverzeichnis

1. Ablashi, D. V., Balachandran, N., Josephs, S. F., Hung, C. L., Krueger, G. R., Kramarsky, B., Salahuddin, S. Z., and Gallo, R. C. (1991). Genomic polymorphism, growth properties, and immunologic variations in human herpesvirus-6 isolates. *Virology* **184**, 545-552.
2. Alconada, A., Bauer, U., Sodeik, B., and Hoflack, B. (1999). Intracellular Traffic of Herpes Simplex Virus Glycoprotein gE: Characterization of the Sorting Signals Required for Its trans-Golgi Network Localization. *The Journal of Virology* **73**, 377-387.
3. Atedzoe, B. N., Menezes, J., D'Addario, M., Xu, J., Ongradi, J., and Ahmad, A. (1999). Modulatory effects of human herpes virus-7 on cytokine synthesis and cell proliferation in human peripheral blood mononuclear cell cultures. *Journal of Leukocyte Biology* **66**, 822-828.
4. Attrill, H. L., Cumming, S. A., Clements, J. B., and Graham, S. V. (2002). The Herpes Simplex Virus Type 1 US11 Protein Binds the Coterminal UL12, UL13, and UL14 RNAs and Regulates UL13 Expression In Vivo. *The Journal of Virology* **76**, 8090-8100.
5. Baird, G. S., Zacharias, D. A., and Tsien, R. Y. (2000). Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 11984-11989.
6. Basu, S., Dubin, G., Basu, M., Nguyen, V., and Friedman, H. M. (1995). Characterization of regions of herpes simplex virus Type 1 glycoprotein E involved in binding the Fc domain of monomeric IgG and in forming a complex with glycoprotein I. *J.Immunol.* **154**, 260-267.
7. Basu, S., Dubin, G., Nagashunmugam, T., Basu, M., Goldstein, L. T., Wang, L., Weeks, B., and Friedman, H. M. (1997). Mapping regions of herpes simplex virus type 1 glycoprotein I required for formation of the viral Fc receptor for monomeric IgG. *J.Immunol.* **158**, 209-215.
8. Baucke, R. B. and Spear, P. G. (1979). Membrane Proteins Specified by Herpes Simplex Viruses V. Identification of an Fc-Binding Glycoprotein. *The Journal of Virology* **32**, 779-789.
9. Bearer, E. L., Breakefield, X. O., Schuback, D., Reese, T. S., and LaVail, J. H. (2000). Retrograde axonal transport of herpes simplex virus: Evidence for a single mechanism and a role for tegument. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 8146-8150.

10. Becker, Y., Asher, Y., Weinberg-Zahlering, E., Rabkin, S., Friedmann, A., and Kessler, E. (1978). Defective herpes simplex virus DNA: circular and circular-linear molecules resembling rolling circles. *Journal of General Virology* **40**, 319-335.
11. Benboudjema, L., Mulvey, M., Gao, Y., Pimplikar, S. W., and Mohr, I. (2003). Association of the Herpes Simplex Virus Type 1 Us11 Gene Product with the Cellular Kinesin Light-Chain-Related Protein PAT1 Results in the Redistribution of Both Polypeptides. *The Journal of Virology* **77**, 9192-9203.
12. Benson, P. M., Malane, S. L., Banks, R., Hicks, C. B., and Hilliard, J. (1989). B virus (Herpesvirus simiae) and human infection. *Arch Dermatol.* **125**, 1247-1248.
13. Boehmer, P. E. and Lehman, I. R. (1997). Herpes simplex virus DNA replication. *Annu Rev Biochem.* **66**, 347-384.
14. Booy, F. P., Trus, B. L., Newcomb, W. W., Brown, J. C., Conway, J. F., and Steven, A. C. (1994). Finding a needle in a haystack: Detection of a small protein (the 12-kDa VP26) in a large complex (the 200-MDa capsid of herpes simplex virus). *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**, 5652-5656.
15. Brandimarti, R. and Roizman, B. (1997). US9, a stable lysine-less herpes simplex virus 1áprotein, is ubiquitinated before packaging into virions and associates with proteasomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**, 13973-13978.
16. Braun, D. K., Batterson, W., and Roizman, B. (1984). Identification and Genetic Mapping of a Herpes Simplex Virus Capsid Protein That Binds DNA. *The Journal of Virology* **50**, 645-648.
17. Brideau, A. D., Banfield, B. W., and Enquist, L. W. (1998). The Us9 Gene Product of Pseudorabies Virus, an Alphaherpesvirus, Is a Phosphorylated, Tail-Anchored Type II Membrane Protein. *The Journal of Virology* **72**, 4560-4570.
18. Brideau, A. D., del Rio, T., Wolffe, E. J., and Enquist, L. W. (1999). Intracellular Trafficking and Localization of the Pseudorabies Virus Us9 Type II Envelope Protein to Host and Viral Membranes. *The Journal of Virology* **73**, 4372-4384.
19. Brideau, A. D., Card, J. P., and Enquist, L. W. (2000). Role of Pseudorabies Virus Us9, a Type II Membrane Protein, in Infection of Tissue Culture Cells and the Rat Nervous System. *The Journal of Virology* **74**, 834-845.
20. Brideau, A. D., Enquist, L. W., and Tirabassi, R. S. (2000). The role of virion membrane protein endocytosis in the herpesvirus life cycle. *Journal of Clinical Virology* **17**, 69-82.
21. Brideau, A. D., Eldridge, M. G., and Enquist, L. W. (2000). Directional Transneuronal Infection by Pseudorabies Virus Is Dependent on an Acidic Internalization Motif in the Us9 Cytoplasmic Tail. *The Journal of Virology* **74**, 4549-4561.

22. Browne, H., Bell, S., Minson, T., and Wilson, D. W. (1996). An endoplasmic reticulum-retained herpes simplex virus glycoprotein H is absent from secreted virions: evidence for reenvelopment during egress. *The Journal of Virology* **70**, 4311-4316.
23. Browne, H., Bruun, B., and Minson, T. (2001). Plasma membrane requirements for cell fusion induced by herpes simplex virus type 1 glycoproteins gB, gD, gH and gL. *Journal of General Virology* **82**.
24. Brunetti, C. R., Burke, R. L., Kornfeld, S., Gregory, W., Masiarz, F. R., Dingwell, K. S., and Johnson, D. C. (1994). Herpes simplex virus glycoprotein D acquires mannose 6-phosphate residues and binds to mannose 6-phosphate receptors. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 17067-17074.
25. Buckmaster, E. A., Gompels, U., and Minson, A. (1984). Characterization and physical mapping of an HSV-1 glycoprotein of approximately 115×10^3 molecular weight. *The Journal of Virology* **139**, 408-413.
26. Campadelli-Fiume, G., Farabegoli, F., Di Gaeta, S., and Roizman, B. (1991). Origin of unenveloped capsids in the cytoplasm of cells infected with herpes simplex virus. *The Journal of Virology* **65**, 1589-95.
27. Campadelli-Fiume, G., Cocchi, F., Menotti, L., and Lopez, M. (2000). The novel receptors that mediate the entry of herpes simplex viruses and animal alphaherpesviruses into cells. *Rev Med Virol.* **10**, 305-319.
28. Cassady, K. A., Gross, M., and Roizman, B. (1998). The Herpes Simplex Virus US11 Protein Effectively Compensates for the gamma 134.5 Gene if Present before Activation of Protein Kinase R by Precluding Its Phosphorylation and That of the alpha α Subunit of Eukaryotic Translation Initiation Factor 2. *The Journal of Virology* **72**, 8620-8626.
29. Cassady, K. A., Gross, M., and Roizman, B. (1998). The Second-Site Mutation in the Herpes Simplex Virus Recombinants Lacking the gamma 134.5 Genes Precludes Shutoff of Protein Synthesis by Blocking the Phosphorylation of eIF-2 α . *The Journal of Virology* **72**, 7005-7011.
30. Cassady, K. A. and Gross, M. (2002). The Herpes Simplex Virus Type 1 US11 Protein Interacts with Protein Kinase R in Infected Cells and Requires a 30-Amino-Acid Sequence Adjacent to a Kinase Substrate Domain. *The Journal of Virology* **76**, 2029-2035.
31. Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., and Prasher, D. C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802-805.
32. Chalfie, M. (1995). Green fluorescent protein. *Photochem Photobiol.* **62**, 651-656.
33. Chi, J. H. and Wilson, D. W. (2000). ATP-Dependent Localization of the Herpes Simplex Virus Capsid Protein VP26 to Sites of Procapsid Maturation. *The Journal of Virology* **74**, 1468-1476.

34. Cocchi, F., Menotti, L., Dubreuil, P., Lopez, M., and 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/HIgr) and Nectin2 (PRR2/HveB). *The Journal of Virology* **74**, 3909-3917.
35. Cody, C. W., Prasher, D. C., Westler, W. M., Prendergast, F. G., and Ward, W. W. (1993). Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the Aequorea green-fluorescent protein. *Biochemistry* **32**, 1212-1218.
36. Collins, W. J. and Johnson, D. C. (2003). Herpes Simplex Virus gE/gI Expressed in Epithelial Cells Interferes with Cell-to-Cell Spread. *The Journal of Virology* **77**, 2686-2695.
37. Cormack, B. P., Valdivia, R. H., and Falkow, S. (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**, 33-38.
38. Cubitt, A. B., Heim, R., Adams, S. R., Boyd, A. E., Gross, L. A., and Tsien, R. Y. (1995). Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci.* **20**, 448-455.
39. Darlington, R. W. and Moss, L. H. (1968). Herpesvirus Envelopment. *The Journal of Virology* **2**, 48-58.
40. Davis-Poynter, N., Bell, S., Minson, T., and Browne, H. (1994). Analysis of the contributions of herpes simplex virus type 1 membrane proteins to the induction of cell-cell fusion. *The Journal of Virology* **68**, 7586-7590.
41. Davison, M. D., Rixon, F. J., and Davison, A. J. (1992). Identification of genes encoding two capsid proteins (VP24 and VP26) of herpes simplex virus type 1. *Journal of General Virology* **73**, 2709-2713.
42. de-The, G., Geser, A., Day, N. E., Tukei, P. M., Williams, E. H., Beri, D. P., Smith, P. G., Dean, A. G., Bronkamm, G. W., Feorino, P., and Henle, W. (1978). Epidemiological evidence for causal relationship between Epstein-Barr virus and Burkitt's lymphoma from Ugandan prospective study. *Nature* **274**, 756-761.
43. Desai, P. and Person, S. (1998). Incorporation of the Green Fluorescent Protein into the Herpes Simplex Virus Type 1 Capsid. *The Journal of Virology* **72**, 7563-7568.
44. Desai, P., DeLuca, N. A., and Person, S. (1998). Herpes simplex virus type 1 VP26 is not essential for replication in cell culture but influences production of infectious virus in the nervous system of infected mice. *The Journal of Virology* **247**, 115-124.
45. Desai, P., Akpa, J. C., and Person, S. (2003). Residues of VP26 of Herpes Simplex Virus Type 1 That Are Required for Its Interaction with Capsids. *The Journal of Virology* **77**, 391-404.

46. Diaz-Latoud, C., Diaz, J. J., Fabre-Jonca, N., Kindbeiter, K., Madjar, J. J., and Arrigo, A. P. (1997). Herpes simplex virus US11 protein enhances recovery of protein synthesis and survival in heat shock treated HeLa cells. *Cell Stress Chaperones* **2**, 119-131.
47. Diaz, J. J., Simonin, D., Masse, T., Deviller, P., Kindbeiter, K., Denoroy, L., and Madjar, J. J. (1993). The herpes simplex virus type 1 US11 gene product is a phosphorylated protein found to be non-specifically associated with both ribosomal subunits. *Journal of General Virology* **74**, 397-406.
48. Diaz, J. J., Dodon, M. D., Schaerer-Uthurralt, N., Simonin, D., Kindbeiter, K., Gazzolo, L., and Madjar, J. J. (1996). Post-transcriptional transactivation of human retroviral envelope glycoprotein expression by herpes simplex virus US11 protein. *Nature* **379**, 273-277.
49. Diefenbach, R. J., Miranda-Saksena, M., Diefenbach, E., Holland, D. J., Boadle, R. A., Armati, P. J., and Cunningham, A. L. (2002). Herpes Simplex Virus Tegument Protein US11 Interacts with Conventional Kinesin Heavy Chain. *The Journal of Virology* **76**, 3282-3291.
50. Dingwell, K. S., Brunetti, C. R., Hendricks, R. L., Tang, Q., Tang, M., Rainbow, A. J., and Johnson, D. C. (1994). Herpes simplex virus glycoprotein E and I facilitate cell-to-cell spread in vivo and across junctions of cultured cells. *The Journal of Virology* **68**, 834-845.
51. Dingwell, K. S., Doering, L. C., and Johnson, D. C. (1995). Glycoproteins E and I facilitate neuron-to-neuron spread of herpes simplex virus. *The Journal of Virology* **69**, 7087-7098.
52. Dingwell, K. S. and Johnson, D. C. (1998). The Herpes Simplex Virus gE-gI Complex Facilitates Cell-to-Cell Spread and Binds to Components of Cell Junctions. *The Journal of Virology* **72**, 8933-8942.
53. Dubin, G., Frank, I., and Friedman, H. M. (1990). Herpes simplex virus type 1 encodes two Fc receptors which have different binding characteristics for monomeric Immunoglobulin G (IgG) and IgG complexes. *The Journal of Virology* **64**, 2725-2731.
54. Dubin, G., Basu, S., Mallory, D. L. P., Basu, M., Tal-Singer, R., and Friedman, H. M. (1994). Characterization of Domains of Herpes Simplex Virus Type 1 Glycoprotein E Involved in Fc Binding Activity for Immunoglobulin G Aggregates. *The Journal of Virology* **68**, 2478-2486.
55. Dubin, G. and 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. *The Journal of Virology* **69**, 4564-4568.

56. Elliott, G. and O'Hare, P. (1999). Live-Cell Analysis of a Green Fluorescent Protein-Tagged Herpes Simplex Virus Infection. *The Journal of Virology* **73**, 4110-4119.
57. Enquist, L. W., Tomishima, M. J., Gross, S., and Smith, G. A. (2002). Directional spread of an alpha-herpesvirus in the nervous system. *Vet Microbiol.* **86**, 5-16.
58. Farnsworth, A., Goldsmith, K., and Johnson, D. C. (2003). Herpes Simplex Virus Glycoproteins gD and gE/gI Serve Essential but Redundant Functions during Acquisition of the Virion Envelope in the Cytoplasm. *The Journal of Virology* **77**, 8481-8494.
59. Fenwick, M. L. and Everett, R. D. (1990). Transfer of UL41, the gene controlling virion-associated host cell shutoff, between different strains of herpes simplex virus. *Journal of General Virology* **71**, 411-418.
60. Foa-Tomasi, L., Avitabile, E., Boscaro, A., Brandimarti, R., Gualandri, R., Manservigi, R., Dall'Ólio, F., Serafini-Cessi, F., and 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. *The Journal of Virology* **180**, 474-482.
61. Frame, M. C., McGeoch, D. J., Rixon, F. J., Orr, A. C., and Marsden, H. S. (1986). The 10K virion phosphoprotein encoded by gene US9 from herpes simplex virus type 1. *The Journal of Virology* **150**, 321-332.
62. Frenkel, N., Schirmer, E. C., Wyatt, L. S., Katsafanas, G., Roffman, E., Danovich, R. M., and June, C. H. (1990). Isolation of a New Herpesvirus from Human CD4+ T Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **87**, 748-752.
63. Furlong, D., Swift, H., and Roizman, B. (1972). Arrangement of Herpesvirus Deoxyribonucleic Acid in the Core. *The Journal of Virology* **10**, 1071-1074.
64. Garner, J. A. (2003). Herpes simplex virion entry into and intracellular transport within mammalian cells. *Advanced Drug Delivery Reviews* **55**, 1497-1513.
65. Geraghty, R. J., Krummenacher, C., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J., and Spear, P. G. (1998). Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor. *Science* **280**, 1618-1620.
66. Gerster, T. and Roeder, R. G. (1988). A Herpesvirus Trans-Activating Protein Interacts with Transcription Factor OTF-1 and Other Cellular Proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **85**, 6347-6351.
67. Giraud, S., Diaz-Latoud, C., Hacot, S., Textoris, J., Bourette, R. P., and Diaz, J. J. (2004). US11 of Herpes Simplex Virus Type 1 Interacts with HIPK2 and Antagonizes HIPK2-Induced Cell Growth Arrest. *The Journal of Virology* **78**, 2984-2993.

68. Gompels, U. and Minson, A. (1986). The properties and sequence of glycoprotein H of Herpes Simplex Virus Type 1. *The Journal of Virology* **153**, 230-247.
69. Granzow, H., Klupp, B. G., Fuchs, W., Veits, J., Osterrieder, N., and Mettenleiter, T. C. (2001). Egress of Alphaherpesviruses: Comparative Ultrastructural Study. *The Journal of Virology* **75**, 3675-3684.
70. Haas, J., Park, E. C., and Seed, B. (1996). Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein. *Curr Biol.* **6**, 315-324.
71. Harman, A., Browne, H., and Minson, T. (2002). The Transmembrane Domain and Cytoplasmic Tail of Herpes Simplex Virus Type 1 Glycoprotein H Play a Role in Membrane Fusion. *The Journal of Virology* **76**, 10708-10716.
72. Heim, R. and Tsien, R. Y. (1996). Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr Biol.* **6**, 178-182.
73. Henle, W. and Henle, G. (1970). Evidence for a relation of Epstein-Barr virus to Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma. *Bibl Haematol.* 706-713.
74. Herold, B. C., Visalli, R. J., Susmarski, N., Brandt, C. R., and Spear, P. G. (1994). Glycoprotein C-independent binding of herpes simplex virus to cells requires cell surface heparan sulphate and glycoprotein B. *Journal of General Virology* **75**, 1211-1222.
75. Hutchinson, L., Browne, H., Wargent, V., Davis-Poynter, N., Primorac, S., Goldsmith, K., Minson, A. C., and 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. *The Journal of Virology* **66**, 2240-2250.
76. Ii, K., Hizawa, K., and Katsuse, R. (1972). Generalized cytomegalic inclusion disease presenting an infectious mononucleosis syndrome (so-called cytomegalovirus mononucleosis) in a previously healthy adult--an autopsy study. *Acta Pathol Jpn.* **22**, 723-737.
77. Inouye, S. and Tsuji, F. I. (1994). Aequorea green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Lett.* **341**, 277-280.
78. Jacob, R. J., Morse, L. S., and 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. *The Journal of Virology* **29**, 448-457.
79. Johnson, D. C. and 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. *The Journal of Virology* **43**, 1102-1112.

80. Johnson, D. C. and Feenstra, V. (1987). Identification of a Novel Herpes Simplex Virus Type 1 - Induced Glycoprotein Which Complexes with gE and Binds Immunoglobulin. *The Journal of Virology* **61**, 2208-2216.
81. Johnson, D. C., Frame, M. C., Ligas, M. W., Cross, A. M., and Stow, N. D. (1988). Herpes simplex virus immunoglobulin G Fc receptor activity depends on a complex of two viral glycoproteins, gE and gI. *The Journal of Virology* **62**, 1347-1354.
82. Johnson, D. C., Webb, M., Wisner, T. W., and Brunetti, C. (2001). Herpes Simplex Virus gE/gI Sorts Nascent Virions to Epithelial Cell Junctions, Promoting Virus Spread. *The Journal of Virology* **75**, 821-833.
83. Johnson, D. C. and Huber, M. T. (2002). Directed Egress of Animal Viruses Promotes Cell-to-Cell Spread. *The Journal of Virology* **76**, 1-8.
84. Johnson, P. A., MacLean, C., Marsden, H. S., Dalziel, R. G., and Everett, R. D. (1986). The product of gene US11 of herpes simplex virus type 1 is expressed as a true late gene. *Journal of General Virology* **67**, 871-883.
85. Kain, S. R., Adams, M., Kondepudi, A., Yang, T. T., Ward, W. W., and Kitts, P. (1995). Green fluorescent protein as a reporter of gene expression and protein localization. *Biotechniques* **19**, 650-655.
86. Khoo, D., Perez, C., and Mohr, I. (2002). Characterization of RNA terminants Recognized by the Arginine- and Proline-Rich Region of Us11, a Herpes Simplex Virus Type 1-Encoded Double-Stranded RNA Binding Protein That Prevents PKR Activation. *The Journal of Virology* **76**, 11971-11981.
87. Koshizuka, T., Takakuwa, H., Goshima, F., Murata, T., and Nishiyama, Y. (2001). The US11 gene product of herpes simplex virus has intercellular trafficking activity. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **288**, 597-602.
88. Kühn, J. E., Kramer, M. D., Willenbacher, W., Wieland, U., Lorentzen, E. U., and Braun, R. W. (1990). Identification of herpes simplex virus type 1 glycoproteins interacting with the cell surface. *The Journal of Virology* **64**, 2491-2497.
89. Löwenstein, A. (1919). Ätiologische Untersuchungen über den fieberhaften Herpes. *Med.Wochenschrift* **769**.
90. Lorentzen, E. U., Eing, B. R., Hafezi, W., Manservigi, R., and Kühn, J. E. (2001). Replication-competent Herpes Simplex Virus Type 1 Mutant Expressing an Autofluorescent Glycoprotein H Fusion Protein. *Intervirology* **44**, 232-242.
91. MacLean, C. A., Rixon, F. J., and Marsden, H. S. (1987). The products of gene US11 of herpes simplex virus type 1 are DNA-binding and localize to the nucleoli of infected cells. *Journal of General Virology* **68**, 1921-1937.

92. Maidji, E., Tugizov, S., Jones, T., Zheng, Z., and Pereira, L. (1996). Accessory human cytomegalovirus glycoprotein US9 in the unique short component of the viral genome promotes cell-to-cell transmission of virus in polarized epithelial cells. *The Journal of Virology* **70**, 8402-8410.
93. McCollum, R. W. (1970). Infectious mononucleosis and the Epstein-Barr virus. *J Infect Dis.* **121** , 347-348.
94. McGeoch, D. J., Dolan, A., Donald, S., and Brauer, D. H. K. (1986). Complete DNA sequence of the short repeat region in the genome of herpes simplex virus type 1. *Nucleic Acids Res.* **14**, 1727-1745.
95. McGeoch, D. J., Dalrymple, M. A., Davison, A. J., Dolan, A., Frame, M. C., McNab, D., Perry, L. J., Scott, J. E., and Taylor, P. (1988). The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *Journal of General Virology* **69**, 1531-1574.
96. McMillan, T. N. and Johnson, D. C. (2001). Cytoplasmic Domain of Herpes Simplex Virus gE Causes Accumulation in the trans-Golgi Network, a Site of Virus Envelopment and Sorting of Virions to Cell Junctions. *The Journal of Virology* **75**, 1928-1940.
97. McNabb, D. S. and Courtney, R. J. (1992). Identification and characterization of the herpes simplex virus type 1 virion protein encoded by the UL35 open reading frame. *The Journal of Virology* **66**, 2653-2663.
98. McNabb, D. S. and Courtney, R. J. (1992). Posttranslational modification and subcellular localization of the p12 capsid protein of herpes simplex virus type 1. *The Journal of Virology* **66**, 4839-4847.
99. Mettenleiter, T. C. (2002). Herpesvirus Assembly and Egress. *The Journal of Virology* **76**, 1537-1547.
100. Miranda-Saksena, M., Boadle, R. A., Armati, P., and Cunningham, A. L. (2002). In Rat Dorsal Root Ganglion Neurons, Herpes Simplex Virus Type 1 Tegument Forms in the Cytoplasm of the Cell Body. *The Journal of Virology* **76**, 9934-9951.
101. Miriagou, V., Stevanato, L., Manservigi, R., and Mavromara, P. (2000). The C-terminal cytoplasmic tail of herpes simplex virus type 1 gE protein is phosphorylated in vivo and in vitro by cellular enzymes in the absence of other viral proteins. *Journal of General Virology* **81**, 1027-1031.
102. Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J. M., Adams, J. A., Ikura, M., and Tsien, R. Y. (1997). Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* **388**, 882-887.
103. Montgomery, R. I., Warner, M. S., Lum, B. J., and Spear, P. G. (1996). Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* **87**, 427-436.

104. Mulvey, M., Poppers, J., Sternberg, D., and Mohr, I. (2003). Regulation of eIF2{alpha} Phosphorylation by Different Functions That Act during Discrete Phases in the Herpes Simplex Virus Type 1 Life Cycle. *The Journal of Virology* **77**, 10917-10928.
105. Neidhardt, H., Schröder, C. H., and Kaerner, H. C. (1987). Herpes Simplex Virus Type 1 Glycoprotein E Is Not Indispensable for Viral Infectivity. *The Journal of Virology* **61**, 600-603.
106. Nishiyama, Y., Kurachi, R., Daikoku, T., and Umene, K. (1993). The US 9, 10, 11, and 12 genes of herpes simplex virus type 1 are of no importance for its neurovirulence and latency in mice. *The Journal of Virology* **194**, 419-423.
107. Niwa, H., Inouye, S., Hirano, T., Matsuno, T., Kojima, S., Kubota, M., Ohashi, M., and Tsuji, F. I. (1996). Chemical nature of the light emitter of the Aequorea green fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**, 13617-13622.
108. Offermann, M. K. (1996). HHV-8: a new herpesvirus associated with Kaposi's sarcoma. *Trends Microbiol.* **4**, 383-386.
109. Ormo, M., Cubitt, A. B., Kallio, K., Gross, L. A., Tsien, R. Y., and Remington, S. J. (1996). Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein. *Science* **273**, 1392-1395.
110. Penfold, M. E. T., Armati, P., and Cunningham, A. L. (1994). Axonal Transport of Herpes Simplex Virions to Epidermal Cells: Evidence for a Specialized Mode of Virus Transport and Assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**, 6529-6533.
111. Peters, G. A., Khoo, D., Mohr, I., and Sen, G. C. (2002). Inhibition of PACT-Mediated Activation of PKR by the Herpes Simplex Virus Type 1 Us11 Protein. *The Journal of Virology* **76**, 11054-11064.
112. Poppers, J., Mulvey, M., Khoo, D., and Mohr, I. (2000). Inhibition of PKR Activation by the Proline-Rich RNA Binding Domain of the Herpes Simplex Virus Type 1 Us11 Protein. *The Journal of Virology* **74**, 11215-11221.
113. Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G., and Cormier, M. J. (1992). Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. *Gene* **111**, 229-233.
114. Puvion-Dutilleul, F. (1987). Localization of viral-specific 21kDa protein in nucleoli of herpes simplex infected cells. *Eur.J.Cell Biol.* **43**, 487-498.
115. Richman, D. D., Buckmaster, A., Bell, S., Hodgman, C., and Minson, A. C. (1986). Identification of a new glycoprotein of Herpes Simplex Virus Type 1 and genetic mapping of the gene that codes for it. *The Journal of Virology* **57**, 647-655.

116. Rixon, F. J. and McGeoch, D. J. (1984). A 3' co-terminal family of mRNAs from the herpes simplex virus type 1 short region: two overlapping reading frames encode unrelated polypeptides one of which has a highly reiterated amino acid sequence. *Nucleic Acids Res.* **12**, 2473-2487.
117. Rixon, F. J., Addison, C., McGregor, A., Macnab, S. J., Nicholson, P., Preston, V. G., and Tatman, J. D. (1996). Multiple interactions control the intracellular localization of the herpes simplex virus type 1 capsid protein. *Journal of General Virology* **77**, 2251-2260.
118. Rizvi, S. M. and Raghavan, M. (2001). An N-Terminal Domain of Herpes Simplex Virus Type I gE Is Capable of Forming Stable Complexes with gI. *The Journal of Virology* **75**, 11897-11901.
119. Roberts, S. R., Ponce de Leon, M., Cohen, G. H., and Eisenberg, R. J. (1991). Analysis of the intracellular maturation of the herpes simplex virus type 1 glycoprotein gH in infected and transfected cells. *The Journal of Virology* **184**, 609-624.
120. Roizman, B. (1979). The structure and isomerization of herpes simplex virus genomes. *Cell* **16**, 481-494.
121. Roizman, B. and Sears, A. E. (1996). Herpes simplex viruses and their replication, p. 2231-2295. In *B.N.Fields, D.M.Knipe and P.M.Howley (eds.), Virology. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.*
122. Roller, R. J. and Roizman, B. (1990). The herpes simplex virus US11 open reading frame encodes a sequence-specific RNA-binding protein. *The Journal of Virology* **64**, 3463-3470.
123. Roller, R. J. and Roizman, B. (1991). Herpes simplex virus 1 RNA binding protein US11 negatively regulates the accumulation of a truncated viral RNA. *The Journal of Virology* **65**, 5873-5879.
124. Roller, R. J. and Roizman, B. (1992). The herpes simplex virus 1 RNA-binding protein US11 is a virion component and associates with ribosomal 60S subunits. *The Journal of Virology* **66**, 3624-3632.
125. Roller, R. J., Monk, L. L., Stuart, D., and Roizman, B. (1996). Structure and function in the herpes simplex virus 1 RNA-binding protein U(s)11: mapping of the domain required for ribosomal and nucleolar association and RNA binding in vitro. *The Journal of Virology* **70**, 2842-2851.
126. Roop, C., Hutchinson, L., and Johnson, D. C. (1993). A mutant herpes simplex virus type 1 unable to express glycoprotein L cannot enter cells, and its particles lack glycoprotein H. *The Journal of Virology* **67**, 2285-2297.
127. Sacchetti, A., Subramaniam, V., Jovin, T. M., and Alberti, S. (2002). Oligomerization of DsRed is required for the generation of a functional red fluorescent chromophore. *FEBS Lett.* **525**, 13-19.

128. Saldanha, C. E., Lubinski, J., Martin, C., Nagashunmugam, T., Wang, L., van der Keyl, H., Tal-Singer, R., and Friedman, H. M. (2000). Herpes Simplex Virus Type 1 Glycoprotein E Domains Involved in Virus Spread and Disease. *The Journal of Virology* **74**, 6712-6719.
129. Schaerer-Uthurralt, N., Erard, M., Kindbeiter, K., Madjar, J. J., and Diaz, J. J. (1998). Distinct domains in herpes simplex virus type 1 US11 protein mediate post-transcriptional transactivation of human T-lymphotropic virus type I envelope glycoprotein gene expression and specific binding to the Rex responsive element. *Journal of General Virology* **79**, 1593-1602.
130. Schirmer, E. C., Wyatt, L. S., Yamanishi, K., Rodriguez, W. J., and Frenkel, N. (1991). Differentiation between Two Distinct Classes of Viruses now Classified as Human Herpesvirus 6. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **88**, 5922-5926.
131. Schneweis, K. E. (1962). Serological studies on the type differentiation of Herpesvirus hominis. *Z Immun exp ther.* **124**, 24-48.
132. Sheldrick, P. and Berthelot, N. (1975). Inverted repetitions in the chromosome of herpes simplex virus. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **39**, 667-678.
133. Shukla, D., Liu, J., Blaiklock, P., Shworak, N. W., Bai, X., Esko, J. D., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J., Rosenberg, R. D., and Spear, P. G. (1999). A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell* **99**, 13-22.
134. Simonin, D., Diaz, J. J., Kindbeiter, K., Pernas, P., and Madjar, J. J. (1995). Phosphorylation of herpes simplex virus type 1 US11 protein is independent of viral genome expression. *Electrophoresis* **16**, 1317-1322.
135. Skepper, J. N., Whiteley, A., Browne, H., and Minson, A. (2001). Herpes Simplex Virus Nucleocapsids Mature to Progeny Virions by an Envelopment {right-arrow} Deenvelopment {right-arrow} Reenvelopment Pathway. *The Journal of Virology* **75**, 5697-5702.
136. Sodeik, B. (2000). Mechanisms of viral transport in the cytoplasm. *Trends in Microbiology* **8**, 465-472.
137. Spear, P. G., Eisenberg, R. J., and Cohen, G. H. (2000). Three classes of cell surface receptors for alphaherpesvirus entry. *Virology* **275**, 1-8.
138. Stackpole, C. W. (1969). Herpes-Type Virus of the Frog Renal Adenocarcinoma. *The Journal of Virology* **4**, 75-93.
139. Stearns, T. (1995). Green fluorescent protein. The green revolution. *Curr Biol.* **5**, 262-264.
140. Stevens, J. G. (1989). Human Herpesviruses: a Consideration of the Latent State. *Microbiol.Rev.* **53**, 318-332.

141. Subak-Sharpe, J. H. and Dargan, D. J. (1998). HSV molecular biology: general aspects of herpes simplex virus molecular biology. *Virus Genes* **16**, 239-251.
142. Thomsen, D. R., Roof, L. L., and Homa, F. L. (1994). Assembly of herpes simplex virus intermediate capsids in insect cells infected with recombinant baculoviruses expressing HSV capsid proteins. *The Journal of Virology* **68**, 2442-2457.
143. Tomishima, M. J. and Enquist, L. W. (2001). A conserved {alpha}-herpesvirus protein necessary for axonal localization of viral membrane proteins. *The Journal of Cell Biology* **154**, 741-752.
144. Torrisi, M. R., di Lazzaro, C., Pavan, A., Pereira, L., and Campadelli-Fiume, G. (1992). Herpes Simplex Virus Envelopment and Maturation Studied by Fracture Label. *The Journal of Virology* **66**, 554-561.
145. Trus, B. L., Homa, F. L., Booy, F. P., Newcomb, W. W., Thomsen, D. R., Cheng, N., Brown, J. C., and Steven, A. C. (1995). Herpes simplex virus capsids assembled in insect cells infected with recombinant baculoviruses: structural authenticity and localization of VP26. *The Journal of Virology* **69**, 7362-7366.
146. Tsien, R. Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem.* **67**, 09-544.
147. Turner, A., Bruun, B., Minson, T., and 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. *The Journal of Virology* **72**, 873-875.
148. van Genderen, I. L., Brandimarti, R., Torrisi, M. R., Campadelli, G., and van Meer, G. (1994). The phospholipid composition of extracellular herpes simplex virions differs from that of host cell nuclei. *The Journal of Virology* **200**, 831-836.
149. Verkhusha, V. V., Akovbian, N. A., Efremenko, E. N., Varfolomeyev, S. D., and Vrzheshch, P. V. (2001). Kinetic Analysis of Maturation and Denaturation of DsRed, a Coral-Derived Red Fluorescent Protein. *Biochemistry* **66**, 1342-1351.
150. Verkhusha, V. V., Kuznetsova, I. M., Stepanenko, O. V., Zарaisky, A. G., Shavlovsky, M. M., Turoverov, K. K., and Uversky, V. N. (2003). High stability of Discosoma Ds Red as compared to Aequorea EGFP. *Biochemistry* **42**, 7879-7884.
151. Wadsworth, S., Jacob, R. J., and Roizman, B. (1975). Anatomy of herpes simplex virus DNA. II. Size, composition, and arrangement of inverted terminal repetitions. *The Journal of Virology* **15**, 1487-1497.
152. Wall, M. A., Socolich, M., and Ranganathan, R. (2000). The structural basis for red fluorescence in the tetrameric GFP homolog Ds Red. *Nat Struct Biol.* **7**, 1133-1138.

153. Ward, P. L., Ogle, W. O., and Roizman, B. (1996). Assemblons: Nuclear Structures Defined by Aggregation of Immature Capsids and Some Tegument Proteins of Herpes Simplex Virus 1. *The Journal of Virology* **70**, 4623-4631.
154. Weller, T. H., Witton, H. M., and Bell, E. J. (1958). The Etiologic Agents of Varicella and Herpes Zoster: Isolation, Propagation, and Cultural Characteristics in Vitro. *The Journal of Experimental Medicine* **108**, 843-868.
155. Westra, D. F., Glazenburg, K. L., Harmsen, M. C., Tiran, A., Jan Scheffer, A., Welling, G. W., Hauw The, T., and Welling-Wester, S. (1997). Glycoprotein H of herpes simplex virus type 1 requires glycoprotein L for transport to the surfaces of insect cells. *The Journal of Virology* **71**, 2285-2291.
156. Whitbeck, J. C., Peng, C., Lou, H., Xu, R., Willis, S. H., Ponce de Leon, M., Peng, T., Nicola, A. V., Montgomery, R. I., Warner, M. S., Soulika, A. M., Spruce, L. A., Moore, W. T., Lambris, J. D., Spear, P. G., Cohen, G. H., and Eisenberg, R. J. (1997). Glycoprotein D of herpes simplex virus (HSV) binds directly to HVEM, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily and a mediator of HSV entry. *The Journal of Virology* **71**, 6083-6093.
157. Whiteley, A., Bruun, B., Minson, T., and Browne, H. (1999). Effects of Targeting Herpes Simplex Virus Type 1 gD to the Endoplasmic Reticulum and trans-Golgi Network. *The Journal of Virology* **73**, 9515-9520.
158. Wingfield, P. T., Stahl, S. J., Thomsen, D. R., Homa, F. L., Booy, F. P., Trus, B. L., and Steven, A. C. (1997). Hexon-only binding of VP26 reflects differences between the hexon and penton conformations of VP5, the major capsid protein of herpes simplex virus. *The Journal of Virology* **71**, 8955-8961.
159. Wisner, T., Brunetti, C., Dingwell, K., and Johnson, D. C. (2000). The Extracellular Domain of Herpes Simplex Virus gE Is Sufficient for Accumulation at Cell Junctions but Not for Cell-to-Cell Spread. *The Journal of Virology* **74**, 2278-2287.
160. WuDunn, D. and Spear, P. G. (1989). Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. *The Journal of Virology* **63**, 52-58.
161. Zhou, Z. H., He, J., Jakana, J., Tatman, J. D., Rixon, F. J., and Chiu, W. (1995). Assembly of VP26 in herpes simplex virus-1 inferred from structures of wild-type and recombinant capsids. *Nat Struct Biol.* **2**, 1026-1030.
162. Zolotukhin, S., Potter, M., Hauswirth, W. W., Guy, J., and Muzyczka, N. (1996). A "Humanized" Green Fluorescent Protein cDNA Adapted for High-Level Expression in Mammalian Cells.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Stefanie Wehmeier
Geburtsort	Herford
Geburtsdatum	16.04.1973
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Konfession	evangelisch
Eltern	Willi Wehmeier Ltd. Kreisverwaltungsdirektor a.D. Lydia Wehmeier, geb. Tödtmann Hausfrau

Schulbildung

01.08.1979-31.07.1983	Grundschule Lippinghausen
01.08.1983-11.06.1992	Gymnasium am Markt, Bünde

Berufsausbildung

01.10.1992-30.09.1995	Ausbildung zur Kinderkrankenschwester, Klinikum Kreis Herford, Herford
-----------------------	---

Hochschulbildung

04/1995-10/2001	Studium der Humanmedizin an der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster
WS 1996/1997	Ärztliche Vorprüfung
WS 1997/1998	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
WS 1999/2000	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
30.10.2001	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

seit 2000
Promotion am Institut für Medizinische
Mikrobiologie, Klinische Virologie des
Universitätsklinikums Münster

Praktisches Jahr

10/2000-02/2001
Neurologie
Krankenanstalten Gilead gGmbH, Bielefeld

02/2001-06/2001
Chirurgie
Kantonsspital Winterthur, Schweiz

06/2001-10/2001
Innere Medizin
Krankenanstalten Gilead gGmbH, Bielefeld

Berufsausübung

01.01.2002-30.06.2003
Ärztin im Praktikum
Krankenanstalten Gilead gGmbH, Bielefeld
Medizinische Klinik

Approbation
01.07.2003
durch Bezirksregierung Detmold

seit 01.08.2003
Assistenzärztin
Klinikum Minden
Institut für Anästhesiologie

Herford, den 25.09.2006