

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

**Baculovirus-vermittelte transiente Genexpression
in Herpes simplex-Virus Typ 1 (HSV-1)-infizierten Säugerzellen**

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

vorgelegt von
Andreas Heid
aus Asanovo

2004

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. H. Jürgens

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

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. M. Simoni

Tag der mündlichen Prüfung: 04.02.2004

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Medizinische Mikrobiologie
Institut für Klinische Virologie
Direktor: Univ.-Prof.Dr.med. G.Peters
Referent: Univ.-Prof. Dr. J. E. Kühn
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. M. Simoni

ZUSAMMENFASSUNG

Baculovirus-vermittelte transiente Genexpression in Herpes simplex-Virus Typ 1 (HSV-1)-infizierten Säugerzellen

Andreas Heid

In der vorliegenden Arbeit wurde die Eignung des Baculovirus-Transduktionssystems zur transienten Proteinexpression in HSV-1-infizierten Zellen untersucht. Es wurde gezeigt, dass das Baculotransfersystem in seiner Transduktionseffizienz anderen kommerziellen Produkten zum Gentransfer (FuGENE6 und LipofectAMINE2000) deutlich überlegen ist. Durch Modifikation des Originalvektors pBacMam2 (Austausch des CAG-Promotors durch den HSV-1-eigenen gD-Promotor, Entfernung der Intron-Exon-Region) blieb die durch das Shutoff-Phänomen in HSV-1-überinfizierten Zellen bedingte Reduktion der Genexpression des Originalvektors aus. Weiterhin erwies sich der gD-Promotor als starker, spezifisch durch die HSV-1-Überinfektion aktivierbarer Promotor. Durch Herstellung von rekombinanten Baculoviren, die autofluoreszierende HSV-1-Fusionskonstrukte exprimierten, und vergleichende Analyse von Transport, Funktion, zeitlicher Verteilungskinetik dieser Fusionskonstrukte in Baculovirus-transduzierten Zellen mit Literaturdaten zur transienten Genexpression in HSV-1-infizierten Zellen wurde am Beispiel des viralen Kapsidproteins VP26 gezeigt, dass die Verwendung des Baculovirus-Transfersystems keine signifikante Beeinflussung der zellbiologischen Eigenschaften rekombinanter Virusproteine verursacht.

1. Einleitung	
1.1 Herpesviridae	1
1.2 Herpes simplex-Virus Typ 1	3
1.2.1 Die Genomstruktur des Herpes simplex-Virus Typ 1	3
1.2.2 Replikativer Zyklus	4
1.2.3 Shutoff-Phänomen in HSV-infizierten Zellen	7
1.2 Gentransfermethoden	9
1.3 Baculovirustransfersystem	12
1.3.1 Baculoviridae	12
1.3.2 Infektionszyklus	12
1.3.3 Entwicklung des Baculovirustransfersystems	14
1.4 Einsatz von GFP (<i>green fluorescent protein</i>) und seiner Derivate	16
1.5 Thema und Aufgabestellung der Arbeit	17
2. Materialien und Methoden	19
2.1 Materialien	19
2.1.1 Chemikalien/Reagenzien	19
2.1.2 Reagenziensysteme	19
2.1.3 Filmmaterial	20
2.1.4 Geräte	20
2.1.5 Verbrauchsmaterialien	21
2.1.6 Enzyme	22
2.1.7 Nukleinsäuren	22
2.1.8 Molekulargewichtstandards	23
2.1.9 Bakterienstämme	23
2.1.10 Medien für die Bakterienkultur	23
2.1.11 Zelllinien	23
2.1.12 Medien und Medienzusätze für die Zellkultur	24
2.1.13 Antikörper	24
2.1.14 Puffer und Lösungen	24

2.2 Methoden	26
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	26
2.2.1.1 Präparation von Plasmid-DNA	26
2.2.1.2 DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen	26
2.2.1.3 DNA-Agarosegelelektrophorese und Fragmentelution	26
2.2.1.4 RNA-Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese	27
2.2.1.5 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	27
2.2.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten	28
2.2.1.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Aufreinigung der PCR-Produkte	28
2.2.1.8 <i>in vitro</i> -Transkription	28
2.2.1.9 Transformation von Bakterien	29
2.2.2 Zellkulturtechniken	30
2.2.2.1 Vero-, MRC-5 und HeLa-Zell-Stammhaltung	30
2.2.2.2 Transfektion der Säugerzellen	30
2.2.2.3 Baculovirus-Transduktion von Säugerzellen	31
2.2.2.4 Infektion der Zellen mit HSV-1	31
2.2.2.5 Kultivierung von Insektenzellen	31
2.2.2.6 Passagieren von Insektenzellen	32
2.2.3 Baculovirus-System	32
2.2.3.1 Herstellung von rekombinanten Baculoviren	32
2.2.3.2 Klonale Aufreinigung bzw. Bestimmung des viralen Titers mittels Plaque-Assay	33
2.2.3.3 Infektion von Insektenzellen und Amplifikation rekombinanter Baculoviren	34
2.2.3.4 Aufkonzentrierung der Viruspartikel	34
2.2.4 Techniken zur Proteindetektion	34
2.2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	34
2.2.4.2 Western Blot	35
2.2.4.3 Fluoreszenzmikroskopie	36
2.2.4.4 SEAP (secreted alkaline phosphatase)-Aktivitätsmessung	36

3. Ergebnisse	37
3.1 Konstruktion von Transfervektoren	37
pBacMam2SEAP	37
pBacMam2EGFP	38
pBacMam2gDproSEAP und pBacMam2gDproT7SEAP	38
pBacMam2gDproEGFP	38
pBacMam2gDproUL35EGFP und pBacMam2gDproUL35ECFP	39
3.2 Testung der T7-Promotor-Funktion	41
3.3 Testung der HSV-1-gD-Promotoraktivität in HSV-infizierten Zellen	42
3.4 Herstellung von rekombinanten Baculoviren durch Kotransfektion	44
3.5 Transduktionseffizienz von rekombinanten Baculoviren im Vergleich zu anderen Transfektionsmethoden	44
3.6 Aufzentrifugation der rekombinanten Baculoviren zur Steigerung der Transduktionseffizienz	46
3.7 Zeitlicher Verlauf der SEAP-Expression unter gD-Promotor-kontrolle und Aciclovir-Effekt auf die Promotoraktivität	47
3.8 Bestimmung der Persistenzdauer von Baculovirus-DNA in transduzierten Zellen	50
3.9 Testung der Aktivierbarkeit des HSV-1 gD-Promotors durch weitere Herpesviren	51
3.10 Transiente Expression viraler autofluoreszierender Fusions-konstrukte mittels Baculovirus-vermittelter Transduktion	52
4. Diskussion	54
4.1 Eigenschaften des Baculovirus-transfersystems	57
4.2 Transiente Expression von VP26EGFP und VP26ECFP mittels Baculovirus-vermittelter Transduktion	59
5. Zusammenfassung	61
6. Literaturverzeichnis	62
7. Danksagung	74
8. Lebenslauf	75

A	Adenin
AcNPV	<i>Autographa californica nuclear polyhedrosis virus</i>
aqua bidest.	zweimal destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CMC	Carboxymethylcellulose
CMV	Cytomegalievirus
CPE	zytopathischer Effekt
dATP	Desoxyadenosin-5-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5-triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5-triphosphat
dTTP	Desoxythymidin-5-triphosphat
ECFP	<i>enhanced cyan fluorescent protein</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
FCS	fötales Kälberserum
G	Guanin
gD	Glykoprotein D
h.p.i.	<i>hours post infection</i>
h.p.t.	<i>hours post transduction</i>
HSV	Herpes simplex-Virus
ICP	<i>infected cell protein</i>
kDa	Kilodalton
LB	Luria Broth (Nährmedium)
M	molar
MEM	<i>minimum essential medium</i>
m.o.i.	<i>multiplicity of infection</i>
ori	<i>origin of replication</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

p.f.u.	<i>plaque forming units</i>
RLU	<i>relative light unit</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
syn	Synzytien-bildend
T	Thymidin
Taq	DNA-Polymerase von <i>Thermus aquaticus</i>
U	Einheit (<i>Unit</i>)
UV	ultraviolettes Licht
VP	<i>virion polypeptide</i>
VZV	Varizella-Zoster-Virus
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen

1. Einleitung

Die HSV-Infektion löst eine Kaskade von intrazellulären Vorgängen aus, deren Regulation sowohl viralen als auch zellulären Kontrollmechanismen unterliegt und fein abgestimmt ist. So ermöglicht eine suffiziente Regulation die Etablierung einer lebenslangen, latenten Persistenz und verhindert den Übertritt der Infektion in das Zentralnervensystem mit Auslösung einer lebensbedrohlichen Infektion des Wirtes. Die Interaktion der daran beteiligten viralen und zellulären Faktoren ist bislang in ihrer Gesamtheit weitgehend unverstanden. Bei vielen Ansätzen zur Untersuchung dieser Faktoren werden Verfahren zur transienten Expression viraler und zellulärer Gene in HSV-permissiven Zellen als Zwischenschritt eingesetzt. Hierzu benötigt man effiziente und untoxische Gentransfermethoden. So war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, das Baculovirus-Transduktionsverfahren als eine neue Gentransfermethode zur Genübertragung in HSV-1-infizierte Zellen zu optimieren und mit anderen in unserem Labor angewandten Gentransfermethoden zu vergleichen. Bevor die Aufgabenstellung dieser Arbeit detailliert erläutert wird, sollen in den folgenden Abschnitten zunächst die diese Arbeit unmittelbar betreffenden Themen wie Herpesviren und Gentransfermethoden vorgestellt werden.

1.1 Herpesviridae

Die Familie der Herpesviren ist in der Natur weit verbreitet und umfasst mehr als 100 Vertreter, die bisher charakterisiert wurden. Herpesviren kommen beim Menschen und bei den meisten Tierarten vor, in vivo weisen sie eine hohe Wirtsspezifität auf. Die Zugehörigkeit zur Familie der Herpesviren wird durch Kriterien wie Architektur des Viruspartikels, Dauer des Replikationszyklus, Wirtsbereich und Zelltropismus bestimmt. Allgemein wird die Familie der Herpesviren in drei Subfamilien unterteilt: *α-Herpesvirinae*, *β-Herpesvirinae* und *γ-Herpesvirinae* (102, 122)

Die Alphaherpesvirinae haben einen kurzen Replikationszyklus, einen relativ breiten Wirtsbereich für in vitro kultivierte Zellen und verursachen einen ausgeprägten CPE (zytopathischer Effekt). Die Betaherpesvirinae besitzen ein relativ enges Wirtsspektrum in vivo sowie in vitro, haben einen längeren Replikationszyklus und verursachen eine geringere Zellschädigung. Die Mitglieder der Gammaherpesvirinae besitzen einen noch

stärker eingengten Wirtsbereich und infizieren fast ausschließlich bereits hochgradig differenzierte Zellen wie lymphoblastoide Zellen.

Die Morphologie und Strukturkomponenten des Viruspartikels sind bei allen Herpesviren ähnlich. Die innerste Struktur des reifen Viruspartikels bildet das etwa 70nm große *Core*, in dem sich das virale Genom in Form eines doppelsträngigen linearen DNA-Moleküls befindet (39). Die Größe des Genoms variiert zwischen 120 und 230 kb (10). Das *Core* ist von einer Proteinhülle, dem Kapsid, umgeben. Das Kapsid hat einen Durchmesser von 88-110 nm und ist aus 162 sogenannten Kapsomeren aufgebaut, die zu einer ikosaedrischen Struktur zusammengelagert sind. Eine elektronenoptisch amorphe und als Tegument bezeichnete Matrix umhüllt das Kapsid und verbindet es mit der äußeren Lipidmembranhülle (*envelope*) des Virus. Die Virushülle ist mit einer Vielzahl von Glykoproteinen assoziiert, die in der elektronenmikroskopischen Darstellung als zahlreiche nach außen gerichtete Anhängsel (*spikes*) der Hüllmembran erkennbar sind. Die Größe des reifen umhüllten Herpesvirions ist recht variabel und liegt zwischen 120 und nahezu 300 nm.

Ein weiteres gemeinsames Merkmal aller Herpesviren ist ihre Fähigkeit, nach Erstinfektion in einem latenten Zustand lebenslang in ihrem natürlichen Wirt zu persistieren. Durch Einwirkung von unterschiedlichen Stimuli, wie physikalische Reizung (z.B. UV-Strahlen), hormonelle Modulation oder Immunsuppression, können die latenten Viren wieder in den lytischen Infektionszyklus eintreten und zu endogenen Rezidivinfekten führen (120).

Derzeit sind neun Vertreter der Herpesvirusfamilie als humanpathogen bekannt (Tab.1). Außerdem ist das primär Rhesusaffen infizierende Herpesvirus *simiae* für den Menschen hochpathogen.

Humane Herpesviren	Subfamilie	Genom-Größe (kbp)	Auswahl einiger typischer, virusassoziierter Erkrankungen
Herpes simplex-Virus Typ 1 (HSV-1)	α	152	Herpes labialis, Herpesvirusenzephalitis, HSV-Keratitis
Herpes simplex-Virus Typ 2 (HSV-2)	α	152	genitale Infektionen, Herpes neonatorum, Meningitis
Varizella-Zoster-Virus (VZV)	α	125	Windpocken, Gürtelrose
Epstein-Barr-Virus (EBV)	γ	172	infektiöse Mononukleose
Zytomegalievirus (CMV)	β	229	meist asymptomatisch bei immunkompetenten Personen, lebensbedrohliche generalisierte Infekte bei Neugeborenen und immunsupprimierten Personen
Humanes Herpesvirus 6 (HHV-6 A, B) ¹	β	162	Exanthema subitum, (Dreitagefieber)
Humanes Herpesvirus 7 (HHV-7)	β	145	Infektion des lymphatischen Systems
Humanes Herpesvirus 8 (HHV-8) (20, 86)	γ	170	Kaposi-Sarkom

Tab. 1 Humanpathogene Herpesviren. ¹ HHV-6 A und B gelten nach neueren Erkenntnissen als unterschiedliche Erregerspezies (107, 1).

1.2 Herpes simplex-Virus Typ 1

1.2.1 Die Genomstruktur des Herpes simplex-Virus Typ 1

Wie bei anderen Herpesviren ist das Genom des HSV-Virions ein lineares doppelsträngiges DNA-Molekül. Das Molekulargewicht der HSV-DNA liegt bei ca. 100×10^6 Dalton, was etwa 150 kbp entspricht. Die Nukleotidsequenz der HSV-1 DNA ist vollständig bekannt, 152 kbp lang und kodiert entsprechend den identifizierten offenen Leserastern für über 70 Polypeptide, von denen nur etwa 30 funktionell charakterisiert sind (79, 78). Das HSV-Genom setzt sich aus einem längeren L-Segment (L für *large*, 126 kbp) und einem kürzeren S-Segment (S für *short*, 26 kbp) zusammen. Beide Segmente enthalten Abschnitte mit einmaligen

Sequenzfolgen, die als *unique long region* (U_L-Region) und *unique short region* (U_S-Region) bezeichnet werden und von invertierten repetitiven Elementen (a, b und c) flankiert werden (100, 125). Die invertierten repetitiven Elemente begünstigen die Rekombinationsvorgänge, über die während der Infektion und Replikation vier isomere Genomformen entstehen (110). Die isomeren Formen des Genoms unterscheiden sich lediglich in der Orientierung der U_L- und U_S-Regionen zueinander (Abb. 1). Alle isomeren Formen kommen in Virionen vor und sind replikationsfähig und infektiös. Die Isomerisierung scheint für das Wachstum des Virus in Zellkultur nicht notwendig zu sein (55).

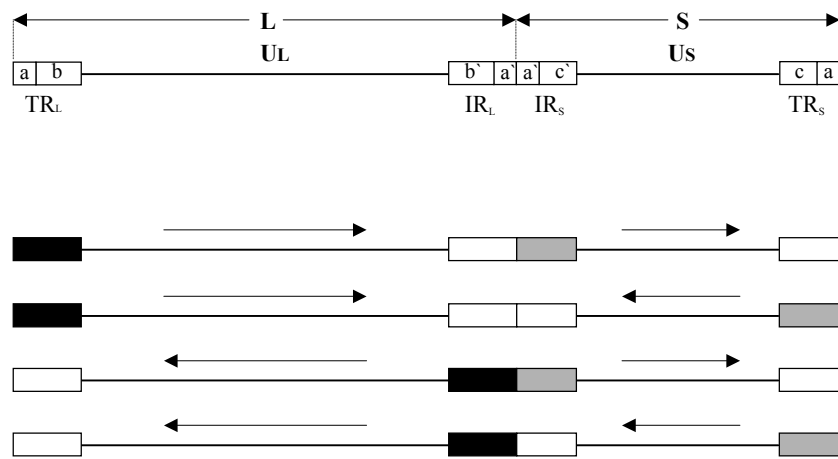


Abb. 1 HSV-1-Genom und vier Genomisomere. TR - *terminal repeat*, IR - *internal repeat*, U_L - *unique long*, U_S - *unique short*. Pfeile zeigen die Orientierung homologer DNA-Sequenzen.

1.2.2 Replikativer Zyklus

Virale Glykoproteine vermitteln im Laufe der Infektion die reversible Anlagerung des Virus an die Zelloberfläche (Adsorption), die anschließend in irreversibles Verschmelzen von Virushülle und Zytoplasmamembran mit darauffolgender Freisetzung von Nukleokapsid und Tegumentproteinen ins Zytoplasma (Penetration) übergeht. Die Hüllmembran des Virus enthält 11 bisher bekannte Glykoproteine (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL, gM), die sich elektronenmikroskopisch als sog. Spikes auf der Virusoberfläche darstellen. Die Glykoproteine B und C (gB und gC) können eine starke Bindung mit Heparansulfatmolekülen der Zelloberfläche eingehen

(135, 51, 64) und somit die Anlagerung von HSV an die Zelloberfläche bewirken. Durch die Interaktion von gD und/oder weiterer viraler Proteine (Heterokomplex aus gH und gL) mit den Zelloberflächenrezeptoren wird anschließend die Viruspenetration ermöglicht (117, 104, 17, 13). Einige an der gD-Bindung beteiligte Zelloberflächenproteine sind näher charakterisiert worden. So gehört der *herpesvirus entry mediator A* (HveA/HVEM/TNFRSF14) der Tumornekrosefaktor-Alpha-Rezeptorfamilie an (85, 130). Nectin-1 (HveC, PRR1, CD111) und Nectin-2 (HveB, PRR2, CD112) sind die Vertreter der Immunglobulin-Superfamilie (23, 40, 127). Von Shukla et al. (1999) wurde Heparansulfat als weiterer möglicher Rezeptor beschrieben, der nach seiner Modifikation durch die D-Glucosaminyl-3-O-Sulfotransferase HveA und Nectin-1 funktionell ersetzen und über Interaktion mit gD den Viruseintritt in die Zelle vermitteln kann (112). Nach dem Eintritt von Nukleokapsid und Tegumentproteinen in das Zytoplasma wird das Nukleokapsid über einen noch unbekanntem Mechanismus unter Beteiligung des zellulären Zytoskeletts (62, 116) zu den Kernporen der Wirtszelle transportiert und dort die virale DNA in das Nukleoplasma freigesetzt. In den Kern gelangen auch einige Tegumentproteine (z.B. VP16 = α TIF), die über ein Kerntransportsignal verfügen. Nach dem Eintritt des viralen Genoms in den Kern induziert VP16 zusammen mit dem zellulären DNA-bindenden Protein Oct-1 die Transkription der α -Gene (*immediate early genes*) (42). Die fünf α -Gene ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 und ICP47 (ICP = *infected cell proteins*) initiieren die Transkription von β -Genen (*early genes*) und hemmen ihre eigene Transkription. Die β -Gene erreichen 5-7h nach Infektionsbeginn ihr Expressionsmaximum und liefern überwiegend Enzyme und nukleinsäurebindende Polypeptide (z.B. virale Thymidinkinase (TK), DNA-Polymerase, Origin-bindendes-Protein (UL9)), die für die virale DNA-Replikation erforderlich sind. Die γ -Gene (*late genes*) werden in die Untergruppen γ 1- (auch β genannt) und γ 2-Gene eingeteilt und kodieren für die meisten Virusstrukturproteine. Die Expression der γ -Gene erfolgt 12-18h nach Infektion und ist bei γ 2-Genen strikt von der Virus-DNA-Replikation abhängig. Die Replikation der Virus-DNA während des lytischen Vermehrungszyklus beginnt an drei definierten Replikationsursprüngen (ori_S1 , ori_S2 , und ori_L) am zuvor zirkularisierten Virus-Genom und erfolgt nach einem "rolling circle"-artigen Mechanismus (6, 54). Dabei entstehen lange konkatemere DNA-Sequenzen mit vielfachen Einheiten des Virusgenoms, die anschließend an spezifischen

Erkennungssequenzen auf Genomlänge zugeschnitten und in zuvor im Kern formierte Kapside verpackt werden. Die DNA-haltigen Nukleokapside knospen durch die innere Zellkernmembran in den Perinuklearraum und erhalten dabei eine Lipidhülle, in die bereits virale Glykoproteine eingelagert sind. Dabei scheint das UL34-Genprodukt eine maßgebliche Rolle zu spielen (103). Die mannosereichen Glykoproteine der Lipidhülle stellen unreife Vorläufer der späteren Hüllmembran-Glykoproteine dar und werden noch posttranslational im Golgi-Apparat prozessiert. Wie der weitere Transport von Virionen vom Perinuklearraum zur Zelloberfläche und deren Freisetzung erfolgt, beschreiben zurzeit zwei sich unterscheidende Modelle (Abb. 2). Nach dem von Stackpole (1969) vorgeschlagenen Modell (*deenvelopment-reenvelopment*-Modell) fusioniert die Virushüllmembran mit der äußeren Kernmembran und das hüllfreie Nukleokapsid gelangt somit ins Zytoplasma. Die nackten Nukleokapside orientieren sich Richtung trans-Golgi-Netzwerk und werden von Teilen der Golgi-Zisternen mit integrierten reifen, viralen Glykoproteinen umhüllt. Dabei entstehen bilamellare Transportvesikel mit einer inneren Membran, die die endgültige Hülle des Virus darstellt, und einer äußeren Membran, die durch anschließende Fusion mit der Zellmembran die Freisetzung der Viren aus der Zelle gewährleistet (118). Ergebnisse aus mehreren neueren Arbeiten unterstützen diesen Transportweg von HSV während der Ausschleusung aus den infizierten Zellen (12, 131, 114, 82). Auch bei den Untersuchungen zum Transport von HSV in Neuronen ließ sich nachweisen, dass der Transport von HSV in terminalen Axonen in Form von nichtumhüllten Kapsiden erfolgt (95). Weiterhin wird dieses Modell durch die Beobachtungen an den verwandten Alphaherpesviren VZV und Pseudorabies-Virus favorisiert (41, 129). Nach dem alternativen Modell von Johnson und Spear wandern die umhüllten Virionen aus dem Perinuklearraum über das endoplasmatische Reticulum mittels Vesikeltransport zum Golgi-Apparat, wo die Glykoproteine modifiziert und die Virusreifung damit abgeschlossen wird. Anschließend werden die infektiösen Virionen in Vesikeln zur Zelloberfläche transportiert und dort unter Verschmelzung der Transportvesikel mit der Zellmembran freigesetzt (57). Die Viren können sich aber auch durch Zell-Zell-Kontakte oder Zellfusion ausbreiten (56, 31).

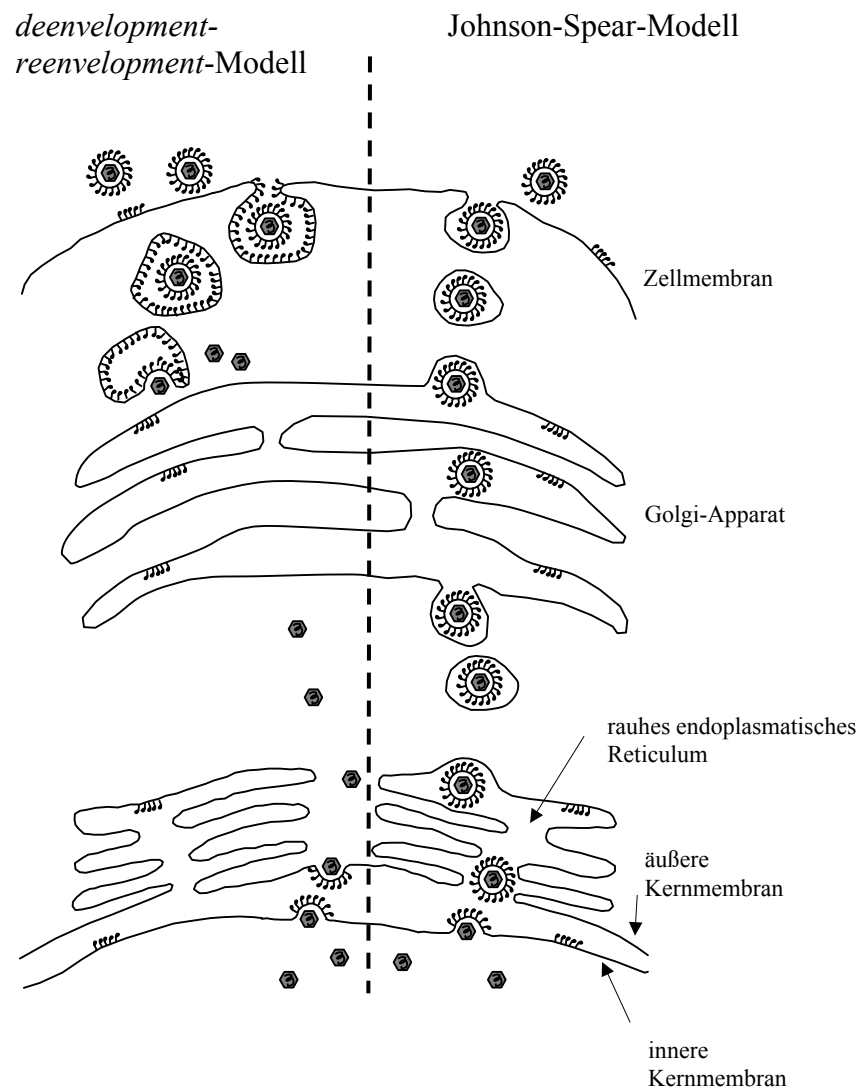


Abb. 2 Schematische Darstellung von zwei Modellen zur Beschreibung des Weges von HSV-Virionen vom Zellkern zum extrazellulären Raum während eines lytischen Zyklus. "~~~~" - HSV-Glykoproteine, ⬡ - HSV-Nukleokapsid. (verändert nach Browne et al., 1996 (12))

1.2.3 Shutoff-Phänomen in HSV-infizierten Zellen

Die Herpes simplex-Virusinfektion verursacht schon in der Frühphase eine Abnahme der Proteinsynthese und -modifikation in der Wirtszelle (101, 123). Dieses sogenannte Shutoff-Phänomen wird in zwei Phasen eingeteilt: primäre Phase oder auch Virion-assoziierte Reduktion der zelleigenen Proteinsynthese, welche durch eine Tegumentkomponente schon vor der viralen Proteinsynthese vermittelt wird, und die sekundäre Phase, die erst nach der Expression viraler Gene erfolgt (91, 36).

Das vhs-Protein (*virion host shutoff protein*), das die primäre Reduktion der Wirtsfunktionen einleitet, wird im Leserahmen UL41 codiert und während der *early/late*-Phase des Infektionszyklus gebildet. Dieses Protein ist für den Abbau und die Destabilisierung der zellulären mRNA-Spezies und somit für die Reduktion der Proteinsynthese nach der Fusion der viralen Hüllmembran und der Zellmembran verantwortlich (90, 106, 121). Da es neben den zellulären auch die viralen mRNA-Moleküle destabilisiert, vermutet man, dass es so den Übergang von der frühen zu der späten Phase der Replikation mitreguliert. Die Aktivität der während des Infektionszyklus neusynthetisierten vhs-Proteine wird durch Komplexbildung mit dem Virusprotein VP16 (ICP25) supprimiert (67, 108). Die vhs-VP16-Komplexe werden in das Tegument neugebildeter Viruspartikel aufgenommen und im nächsten Infektionszyklus in das Zytoplasma der neuen Wirtszelle abgegeben (115). Für die Freigabe der Komplexe aus dem Tegument scheint das Virusprotein UL13 (Proteinkinase) eine noch nicht klar definierte Rolle zu spielen (93). Wie die destabilisierende Wirkung des vhs-Proteins auf die mRNA zustande kommt, ist noch nicht eindeutig geklärt. Die Arbeit von Zelus *et al.* 1996 (140) deutet daraufhin, dass das vhs-Protein eine RNase ist. Allerdings bedarf es weiteren Untersuchungen, um diese Annahme eindeutig zu bestätigen.

Die sekundäre Phase des Shutoff-Phänomens wird durch das α -Protein ICP 27 (UL54) bedingt, das in der *immediate early*-Phase des Infektionszyklus gebildet wird. Durch Hemmung der Spleißvorgänge an RNA-Primärtranskripten in der Wirtszelle bewirkt ICP27 einen Rückgang an neusynthetisierter zellulärer mRNA (49, 48). Da die meisten HSV-1-RNA-Transkripte im Gegensatz zu der Mehrzahl der zellulären RNA-Transkripte nicht gespleißt werden, entsteht durch die Wirkung von ICP27 ein Vorteil für die virale Proteinsynthese. Die Komplexität des Spleißvorganges selbst erschwert die Erforschung des genauen Inhibitionsmechanismus von ICP27. Als einer der möglichen Eingriffspunkte von ICP27 am Spleißvorgang wird die Interaktion von ICP27 mit dem zellulären Protein SAP145 (Spleißosom-assoziiertes Protein), einem der vielen am Spleißen beteiligten zellulären Proteine, vermutet (14).

1.2 Gentransfermethoden

Mittlerweile steht eine Vielfalt an Techniken mit unterschiedlichen Grundlagen und Potentialen zur Verfügung. Hinsichtlich deren Grundlagen lassen sich die meisten Methoden in 2 Hauptgruppen einteilen: physikalische und chemische Transfertechniken sowie auf Viren basierende Systeme.

Zu den physikalischen Methoden gehört in erster Linie die Elektroporation. Dabei werden die Zellen in einer isotonischen Lösung mit nackter DNA gemischt und einem elektrischen Feld hoher Spannung ausgesetzt, wodurch sich Poren in der Zellmembran bilden. Die DNA-Moleküle können sich dann frei in die „elektroporierte“ Zelle bewegen (2, 97). Weitere physikalische Methoden des Gentransfers sind die auch *in vivo* anwendbaren Methoden der direkten Mikroinjektion von DNA in die Zellen oder die Verwendung der sogenannten Genkanone (*gene gun*) (18, 136). Allerdings sind die beiden letztgenannten Methoden aufwändig, haben sich aber bei der Herstellung von transgenen Tieren bzw. Pflanzen als Methoden der ersten Wahl bewährt.

Die chemische Gentransfersysteme beruhen auf der Komplexierung von DNA mit mittlerweile zahlreichen eigens hierfür entwickelten Reagenzien und deren Aufnahme in die Zelle durch verschiedene Prozesse, wie rezeptorvermittelte Endozytose, Pinozytose oder Membranfusion. Die Calciumphosphatmethode war bis zur Entwicklung der lipidvermittelten Gentransfertechnik die meistverwendete Methode, um DNA in Säugetierzellen einzubringen. Für die calciumphosphatvermittelte Transfektion wird die gereinigte DNA mit Calciumchlorid in Gegenwart von Phosphat zusammengebracht, womit man die Bildung von feinem DNA-Calciumphosphatpräzipitat induziert (133), das durch Endocytose in kultivierte Zellen aufgenommen wird (105). Die liposomenvermittelte Gentransfermethode basiert auf der Eigenschaft von Lipidmolekülen, sich spontan in wässriger Lösung zu künstlichen Membranvesikeln zusammenlagern zu können, wobei die in der Lösung vorhandenen Makromoleküle wie DNA mit einer Lipiddoppelschicht umschlossen werden. Durch Fusion mit der Zellmembran der Zielzellen schleusen die Lipidvesikel ihren Inhalt in die Zellen ein (76). Durch Addition von entsprechenden Proteinen (beispielsweise: Antikörper, Transferrin, Virushüllproteine) an solche DNA-Lipid-Partikel kann der DNA-Transfer auf bestimmte Zelltypen spezifiziert werden bzw. ein breiteres Zellspektrum erreicht werden. Auch kationische Lipide, die mit DNA durch ionische

Wechselwirkungen Partikel bilden, welche durch Endocytose in die Zelle aufgenommen werden (139), eignen sich zur Genübertragung (68, 69). Der mögliche Einsatz der lipidbasierten Techniken zum Gentransfer in lebende Organismen mit therapeutischer Zielsetzung führte zu einer rapide wachsenden Zahl an Weiterentwicklungen und Modifikationen dieser Methoden, so dass eine Darstellung aller möglicher Verbesserungen, die zur Zeit erforscht werden, in dieser Arbeit nicht möglich ist.

Alle nichtviralen Genübertragungsmethoden erweisen sich im allgemeinen als nicht sehr effizient. Zudem verursachen die meisten dieser Methoden auch ausgeprägte morphologische Veränderungen der behandelten Zellen. Allerdings sind sie vor allem wegen ihrer zum Teil sehr einfachen Handhabung und potentieller Sicherheitsrisiken bei der alternativen Verwendung viraler Transfersysteme interessant.

Virale Systeme als effiziente Alternative zu physikalisch-chemischen Techniken nutzen zum Gentransfer die natürliche Eigenschaft von Viren aus, Zielzellen sehr effektiv zu infizieren und ihr Genom in die Zellen einzuschleusen. Einige Viren erreichen durch Integration ihres eigenen Genoms in das zelluläre Genom oder episomale Replikation unbegrenzte Persistenz in den Wirtszellen. Die derzeit gängigen viralen Systeme sind auf Retroviren, Adenoviren oder Adeno-assoziierten Viren als Transportvehikel aufgebaut (Tab. 2A). Auch auf der Basis von anderen Viren, z.B. Herpesviren, Pockenviren, Alphaviren, Baculoviren, wurden erfolgreiche Gentransfertechniken aufgebaut (Tab. 2B). Typischerweise werden bei rekombinanten Viren gezielt die für Replikation bzw. Zytotoxizität zuständigen Gene deletiert, um replikationsunfähige Viruspartikel zu erhalten und somit die zu transduzierenden Zellen vor einer lytischen Infektion zu bewahren. Durch Entfernung von viruseigenen Genen wird zusätzlich die Aufnahmekapazität des viralen Genoms für heterologe Gene gesteigert. Auch bei den viralen Vektorsystemen lässt sich die Zelltypspezifität durch Austauschen, Modifizieren oder Hinzufügen von Oberflächenproteinen variieren (89, 132). Die meisten viralen Gentransfersysteme wurden jedoch für den Einsatz in der Gentherapie entwickelt und sind daher hinsichtlich ihrer Komplexität, materiellen und zeitlichen Aufwandes, möglicher Rückrekombination zum Wildtypvirus und damit einem potentiellen Sicherheitsrisiko für den Anwender als Alternative zu physikalisch-chemischen Techniken für den täglichen Gebrauch weniger geeignet. Demgegenüber bot sich das Baculovirustransfersystem durch seine einfache Handhabung, Ableitung von primär

nicht humanpathogenen Viren und damit relativ niedrigem Sicherheitsrisiko, hohe Transduktionseffizienz und breites Zellspektrum für unsere Arbeitsgruppe als eine viel versprechende Alternative an.

Vektor	Retroviren	Adenoviren	Adeno-assoziierte Viren
Genom	RNA	DNA	DNA
max. Kapazität für Gentransfer	≈ 8 kb	≈ 7,5 kb (bis 35 kb) ¹	≈4,5 kb
Transduktion ruhender Zellen	nicht möglich ²	möglich	möglich
Dauer der Genexpression	anhaltend durch Integration	transient	anhaltend / transient (gewebeabhängig)
Vorteile	hohe Transduktions-raten, nicht limitierte Expression	hohe Transduktions-raten, auch ruhende Zellen erreichbar	hohe Transduktionsraten, hohe Stabilität der Viren
Nachteile/ Risiken	Insertionsmutagenese / Herstellung wt-ähnlicher Viren	hauptsächlich Transduktion epithelialer Zellen / Herstellung wt-ähnlicher Viren	Herstellung des Vektors kompliziert, niedrige Kapazität / Herstellung wt-ähnlicher Viren
Literatur	65, 15	63, 138	16, 66

Tab. 2A Übersicht über Hauptmerkmale einiger viralen Vektorsysteme. ¹ bei Ersatz der gesamten codierenden Region. ² Ausnahme: Lentivirale Vektoren.

Vektor	Herpesviren	Pockenviren	Alphaviren
Genom	DNA	DNA	RNA
max. Kapazität für Gentransfer	40 kb	25 kb	2 kb
Transduktion ruhender Zellen	möglich	möglich	möglich
Dauer der Genexpression	transient	transient	transient
Vorteile	Transduktion auch neuronaler Zellen	besonders geeignet als rekombinante Vakzinen	besonders geeignet als rekombinante Vakzinen
Nachteile/ Risiken	Herstellung des Vektors kompliziert, Zyto-toxizität / Herstellung wt-ähnlicher Viren	Zytotoxizität	Zytotoxizität / Herstellung wt-ähnlicher Viren
Literatur	43, 44	87, 94	8, 75

Tab. 2B Übersicht über Hauptmerkmale einiger viraler Vektorsysteme.

1.3 Baculovirustransfersystem

1.3.1 Baculoviridae

Baculoviren sind umhüllte stäbchenförmige Viren mit einem 88 - 153 kbp großen Genom aus zirkulärer, doppelsträngiger DNA. Die bisher beschriebenen Baculoviren wurden aus Arthropoden, insbesondere aus Insekten der Ordnung *Lepidoptera* isoliert. Die Vertreter der Baculoviridae lassen sich aufgrund ihrer Morphologie in drei Subgruppen unterteilen: A, B, und C. Viren der Untergruppe A, die sog. Kernpolyhedroviren (*nuclear polyhedrosis viruses* (NPVs)), bilden im Kern der infizierten Wirtszelle Proteineinschlusskörperchen (*Polyhedra*), in die zahlreiche reife Virionen verpackt und damit nach der Zellyse vor Umwelteinflüssen geschützt werden. Viren der Untergruppe B, die sog. Granuloseviren (*granulosis viruses* (GVs)), bilden ebenfalls Einschlusskörperchen, in die jeweils nur ein Virion verpackt wird. Die Baculoviren der Untergruppe C (*nonoccluded baculoviruses* (NOBs)) bilden keine Einschlusskörperchen um die Virionen. Die Virushülle (*envelope*) der Kernpolyhedroviren (NPVs) kann ein oder auch mehrere Nukleokapside enthalten. Diese Eigenschaft führte zu einer noch häufig anzutreffenden Aufteilung der Untergruppe A in SNPVs (*single NPVs*) und MNPV (*multiple NPVs*), die aber keine phylogenetische Signifikanz zu besitzen scheint (70). Der entgeltliche Name des jeweiligen Virus leitet sich meistens vom Wirtsorganismus ab, aus dem das Virus zuerst isoliert wurde. Das in dieser Arbeit verwendete *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* (AcNPV) wurde aus dem Eulenfalter (Fam. Noctuidae) *Autographa californica* isoliert und ist das bestcharakterisierte Baculovirus aus der Gruppe der Kernpolyhedroviren.

1.3.2 Infektionszyklus

In der Umgebung werden die NPV's auf Pflanzenoberflächen oder im Erdreich vorgefunden. Die durch Polyhedrineinschlusskörperchen vor Umwelteinflüssen geschützten Virionen bleiben auf lange Zeit infektiös. Die Freisetzung der Virionen erfolgt im Mitteldarm einer Raupe, wo die Einschlusskörperchen mit der aufgenommenen Nahrung hohen pH-Werten (>10) ausgesetzt werden. Eine weitere Eigenschaft der Baculoviren ist die Produktion von zwei Virionen-Phänotypen:

Virionen, die den Polyhedrineinschlusskörperchen entstammen und primär das Mitteldarmepithel infizieren, werden als PDV (polyhedra-derived virus) bezeichnet; die andere Form von Virionen, die sich in weiteren Geweben wie Fettgewebe, Muskeln, Hämozyten und Epithelien eines infizierten Insekts verbreitet, werden als BV (budded virus) bezeichnet (Abb. 3). Nachdem die Virionen des PDV-Phänotyps im Mitteldarm freigesetzt werden, gelangen sie durch Fusion der Virushülle mit der Zellmembran in Darmepithelien. Die Nukleokapside werden zum Zellkern transportiert, entpackt und das Virusgenom wird repliziert. Die Freisetzung der Nachkommenviren aus der Zelle erfolgt auf zwei unterschiedlichen Wegen. Beim Entstehen des PDV-Phänotyps erhalten die Nukleokapside im Zellkern die endgültige Hülle, dabei können mehrere Nukleokapside zusammen in eine Hülle geschlossen werden. Anschließend erfolgt noch im Zellkern die Verpackung der Virionen in Polyhedrineinschlusskörperchen. Die endgültige Freisetzung der Einschlußkörperchen in die Umgebung erfolgt dann erst nach der Zellyse. Beim Entstehen des BV-Phänotyps erhalten die Nachkommenkapside ihre primäre Hülle beim Knospen durch die Kernmembran, die sie beim weiteren Transport durch das Zytoplasma jedoch wieder verlieren. Erst beim Knospen durch die Zellmembran erhalten sie ihre endgültige Hülle. Bei den auf diese Weise freigesetzten Viren ermöglicht die Hüll-Zusammensetzung ein deutlich breiteres Infektionsspektrum, so dass die Viren des BV-Phänotyps für die Sekundärinfektion weiterer Geweben des infizierten Insekts verantwortlich sind. Weiterhin unterscheiden sich die beiden Virion-Phänotypen auch in ihrem Zelleintrittsmechanismus. Die Viren des BV-Phänotyps werden im Gegensatz zu der oben beschriebenen Fusion der Zellmembran mit der Hülle der PDV's durch eine adsorptive Endozytose mit intakter Virushülle in das Zellinnere aufgenommen.

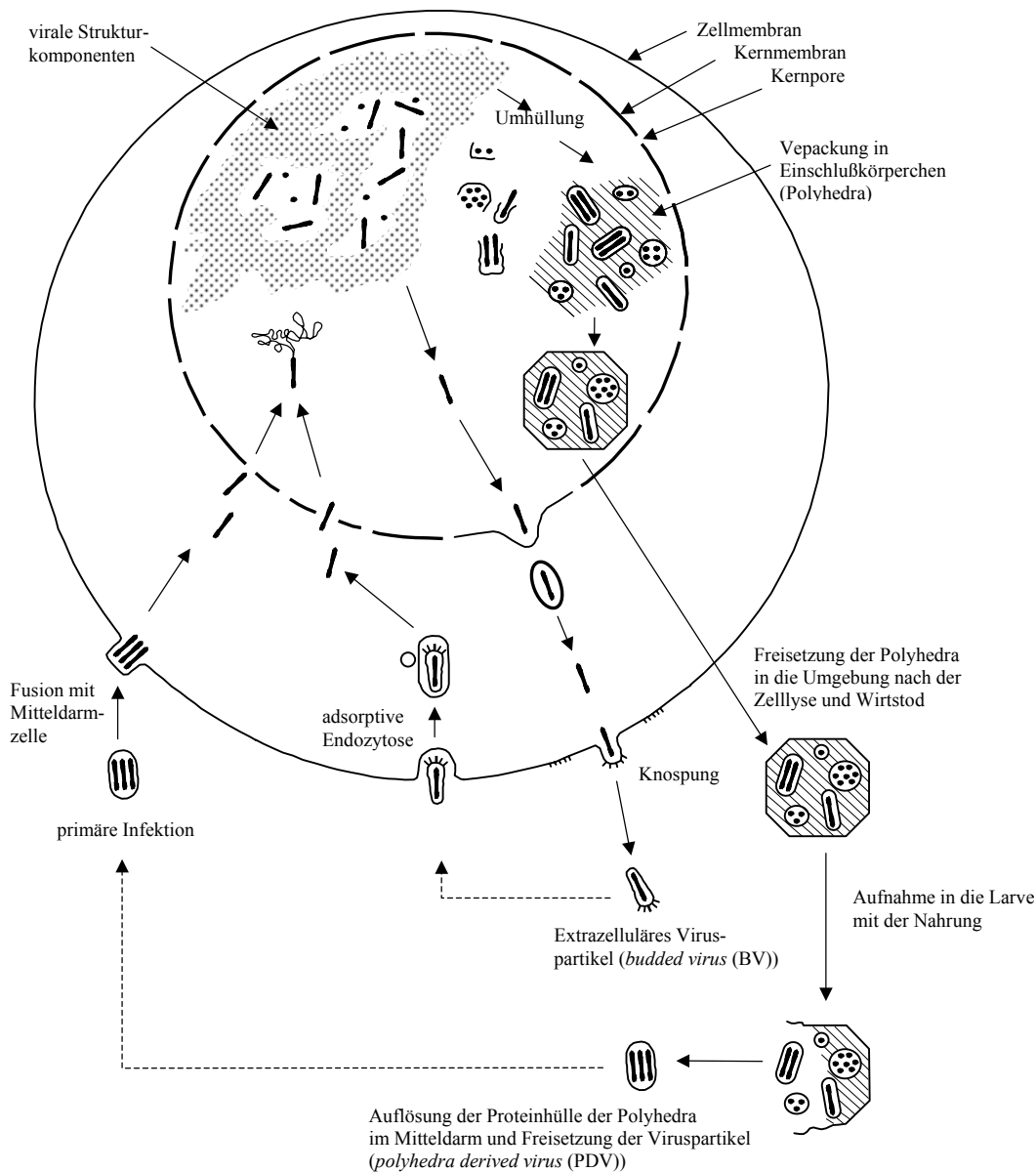


Abb. 3 Infektionszyklus der Baculoviren

1.3.3 Entwicklung des Baculovirustransfersystems

Bereits in den 50-er Jahren wurden Baculoviren als biologisches Insektizid verwendet und werden seit Mitte der 80-er Jahre zur Herstellung rekombinanter Proteine eingesetzt (58). Die Eigenschaft von Baculoviren, auch an Wirbeltierzellen zu binden und ins Zellinnere zu gelangen ohne eine anschließende Expression von viralen Genen initiieren zu können, wurde schon 1983 beschrieben (124). Anhand dieser Eigenschaft wurde von Hofmann et al. 1995 erstmals die Möglichkeit eines baculovirusvermittelten

Gentransfers in humane Hepatozyten untersucht (52). Dazu wurden rekombinante Baculoviren hergestellt, die das Luciferase-Gen als Expressionsmarker unter CMV-*immediate early*-Promotorkontrolle trugen und nach Transduktion der menschlichen Hepatozyten eine deutlich höhere Expressionsrate im Vergleich zu Transfektion mit Calciumphosphat und Lipofection zeigten. Dabei wurde während der Baculovirusinfektion keine viruseigene Genaktivierung festgestellt, die Transduktion verursachte keine feststellbaren zytopathischen Effekte. Anschließend wurden zahlreiche Zelllinien auf deren mögliche Transduktion mit Baculoviren durch andere Arbeitsgruppen untersucht (11, 25) und es erfolgte die Entwicklung fertiger Baculovirustransferkits für Expressionsanalysen. Der in dieser Arbeit als Ausgangsvektor verwendete Baculovirus-Transfervektor pBacMam2 stellt eine dieser Entwicklungen dar, für eine effiziente Proteinexpression in HSV-1-infizierten Zellen musste er jedoch modifiziert werden (s.u.). Der vom Hersteller angebotene pBacMam2-Vektor enthält Sequenzen, die den Polyhedrin-Genlocus des *Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus* (AcNPV) mit Anteilen des für die Virusvermehrung essentiellen Gens ORF 1629 und eines nicht essentiellen Gens ORF 603 flankieren (59, 60, 4). Die kodierenden Sequenzen des Polyhedrin-Gens und des Polyhedrin-Promotors wurden durch Elemente wie CAG-Promotor (s.u.), Polylinker (MCS) und Terminationsstelle ersetzt, die für die Klonierung und Expression von zu untersuchenden Zielsequenzen in Säugetier-Zellen notwendig sind. Die zu untersuchende Fremdgene werden in den Polylinker unter den Einfluss des starken und in einem breiten Zellspektrum konstitutiv aktiven CAG-Promotors (zusammengesetzt aus CMV *ie enhancer*, Huhn- β -Aktin-Promotor und Anteilen von Kaninchen- β -Globin-Gen (111, 84)) kloniert und die entstandenen Transfervektoren für die Herstellung von rekombinanten Baculoviren eingesetzt (Abb. 4).

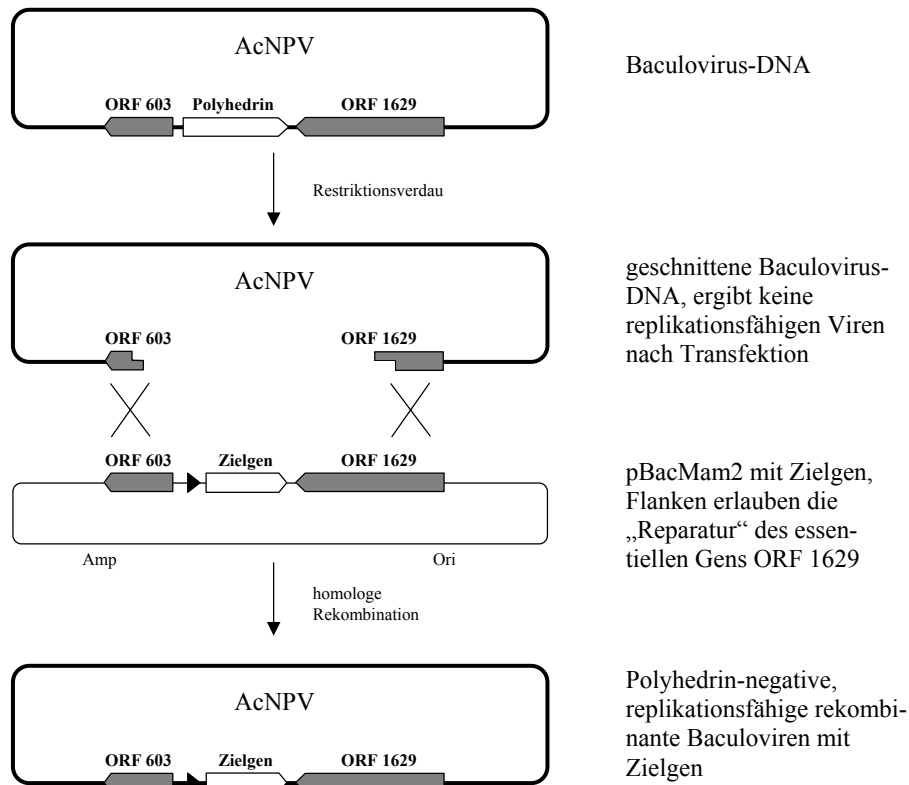


Abb. 4 Schema zur Erzeugung von rekombinanten Baculoviren. ► Promotor (CMV *ie enhancer/chicken β actin*-Promotor bzw. HSV-1 gD-Promotor für die Zielgenexpression in Säugetier-Zellen)

1.4 Einsatz von GFP (*green fluorescent protein*) und seiner Derivate

Das am besten untersuchte GFP stammt von einer Tiefseequalle (*Aequorea victoria*). Seine biochemische Charakterisierung begann in den Sechziger-Jahren und wurde 1992 durch die Klonierung der cDNA von wt-GFP (Wild-Typ-GFP) beschleunigt (98). Die Autofluoreszenz von GFP, d.h. seine Fähigkeit, nach Anregung mit Blau- oder UV-Licht grünes Licht zu emittieren, wobei kein Zusatz von weiteren Substraten, keine Fixierung oder Lyse der Zellen erforderlich ist, ermöglicht es, Genexpression und Genregulation in intakten, lebenden Zellen zu beobachten (19). Auch beim Einsatz als autofluoreszierender Marker (*tag*) von Proteinen erwies sich GFP durch seine Eigenschaften wie Beibehaltung der Fluoreszenz und fehlende oder nur geringe Beeinflussung der Wirtsproteinsynthese als ein hilfreiches Instrument zur Darstellung von subzellulären Organellen und Vorgängen *in vivo* (27, 119). Ferner wurden durch gezieltes Einfügen von Mutationen in der Chromogenregion des wt-GFP mehrere GFP-

Derivate mit verbesserten Eigenschaften entwickelt. Durch den Austausch von 2 Aminosäuren (F64L, S65T) der Chromogenregion im wt-GFP entstand das EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) mit deutlich erhöhter Fluoreszenzintensität und Verschiebung des Exzitationsmaximums von 395 nm (wt-GFP) auf 488 nm (26). Das ECFP (*enhanced cyan fluorescent protein*) wurde ebenfalls von wt-GFP abgeleitet und besitzt sein Emissionsmaximum im kurzwelligeren blauen Bereich des Lichtspektrums (50, 83). Zusätzlich wurde die Expression der wt-GFP-Derivate in Säugetier-Zellen verbessert, indem durch Austausch einzelner Basenpaare in zahlreichen wt-GFP-Codons deren Zusammensetzung (codon usage) derjenigen menschlicher Gene (*open reading frame*) genähert wurde. (46, 142). Ende der 90-er Jahre wurden mehrere Arbeiten publiziert, in denen Daten zur Expression, Funktion, Transport und Verteilung herpesviraler Proteine mit Hilfe von GFP bzw. seiner Derivate vorgestellt wurden. So ließ sich beispielsweise durch Bildung eines EGFP-Fusionsproteins mit ICP0 (Vmw110) dessen Auswirkung auf den Zellzyklus näher charakterisieren (72). Auch die Herstellung eines TK-GFP-Fusionsprotein ermöglichte Untersuchungen, die die Daten über die zelluläre Verteilung der Thymidinkinase vervollständigten (71, 29). Weiterhin wurden verschiedene rekombinante, GFP-Fusionsproteine exprimierende HSV-1-Mutanten generiert, mit deren Hilfe die direkte Darstellung von viralen Komponenten während des Infektionszyklus ermöglicht wurde (34, 30, 103, 38, 37, 74). Somit eröffneten GFP und seine Derivate in den letzten Jahren auch neue Perspektiven in der funktionellen Analyse der viralen Replikation.

1.5 Thema und Aufgabestellung der Arbeit

Thema des Forschungsprojektes, in dessen Rahmen diese Arbeit durchgeführt wurde, ist die Analyse des räumlichen und zeitlichen Transport- und Ausbreitungsmusters von HSV in intakten Zielzellen. Eine wesentliche Voraussetzung für dieses Vorhaben ist die effiziente Übertragung fremder genetischer Information in Säugerzellen. Weiterhin ist die Wahl der Markergene für Genexpression und Proteinlokalisierung, der Promotoren und der Art der Gentransfermethode für die erfolgreiche Durchführung eines Transfers von Genen von entscheidender Bedeutung. Aus den derzeit gängigen Vektorsystemen bot sich das Baculovirustransfersystem durch seine hohe Effizienz (52, 5, 111), breites Spektrum an zugänglichen Zelllinien (25), relativ einfache Handhabung und nicht

zuletzt durch niedriges Sicherheitsrisiko für den Nutzer im Vergleich zu anderen viralen Systemen (53, 45) besonders an. Die Aufgabenstellung dieser Arbeit war daher, dieses Gentransfersystem auf seine Eignung zur Transduktion von HSV-1-permissiven Zellen zu untersuchen und durch Modifikation des Expressions- bzw. Transfervektors die Eigenschaften des Baculovirus-Transduktionssystems für den Einsatz in HSV-1-infizierten Zellen zu optimieren.

Um die Expression der eingeschleusten Gene hauptsächlich auf die mit HSV-1-infizierten Zellen zu beschränken und die eventuelle Inaktivierung der Genexpression durch den *virus host shut-off*-Effekt nach HSV-1-Infektion zu vermeiden, sollte im ersten Abschnitt der Arbeit der vektoreigene Promotor (CMV *ie enhancer*, *chicken β -actin promoter*) mit dem dahintergelegenen Intron aus dem Ausgangsvektor pBacMam2 (Novagen) durch den HSV-1-Glykoprotein D (gD)-Promotor ersetzt werden. Hierbei sollte die Einklonierung der Genexpressionsmarker SEAP (*secreted alkaline phosphatase*) und EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) es ermöglichen, die Eigenschaften von Ausgangsvektor und seinem Derivat (pBacMam2gDpro) zu vergleichen. Anschließend sollten mit Hilfe der Konstrukte pBacMam2gDproEGFP und pBacMam2gDproSEAP rekombinante Baculoviren hergestellt werden und deren Eigenschaften untersucht werden. Im zweiten Abschnitt sollten mit Hilfe des modifizierten Transduktionssystems verschiedene virale autofluoreszierende Fusionskonstrukte exprimiert und funktionell charakterisiert werden.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 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 (1,4- <i>Diazabicyclo(2.2.2)octane</i>)	Sigma, München
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma, München
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Histofluid	Engelbrecht, Edermünde
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Riedel-deHaën, Seelze
MOPS (3- bzw.4- <i>Morpholinepropanesulfonic acid</i>)	Sigma, München
Nusieve 3:1 Agarose	Biozym, Oldendorf
D(+)-Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe
Seakem GTG Agarose	Biozym, Oldendorf
Wasserstoffperoxid 30%	Merck, Darmstadt

2.1.2 Reagentiensysteme

QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
Great EscAPe SEAP Chemiluminescence Detection Kit	Clontech, Heidelberg
Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
BacVector-3000 (bzw. 1000) DNA Kit	Novagen, Madison, USA

FuGENE™6 Transfection Reagent
LipofectAMINE™ 2000 Reagent

Roche, Mannheim
GibcoBRL, Eggenstein

2.1.3 Filmmaterial

Elite Chrome 400
TURA 200 DX Chrome

Kodak AG, Stuttgart
Tura AG, Düren

2.1.4 Geräte

CO₂-Begasungsbrutschrank
Hera Safe 15 (Sicherheitswerkbank)
Berthold Luminometer
Thermocycler GeneAmp® PCR System 9700
Pro II Ne-1540 (Mikrowellenofen)
Unitek HB-130 (Heizblock)
pH 535 Multi Cal (pH-Meter)
Labor-Autoklav La-MCS-203
Pipettus-Akku (Pipettierhilfe)
Vortex Reax Top
UV-Tisch, Photodokumentationskamera

Heraeus, Düsseldorf
Heraeus, Düsseldorf
Berthold DS GmbH, Pforzheim
Perkin-Elmer, Überlingen
Panasonic, Japan
Salmon Electronics Ltd, England
WTW, Weilheim
Asolf Wolf SANOcav, Geislingen
Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Heidolph, Nürtingen
Biometra, Göttingen

Elektrophoresenetzgeräte

Phero-Stab 0312
PharmaciaLKB-EPS 500/400

Biotec-Fischer, Reiskirchen
Pharmacia-LKB, Freiburg

Gelkammern

Agarose-Horizontalgelkammer
Vertikal-Gelelektrophoresekammer XCell II
(Polyacrylamidgele)

Biotec-Fischer, Reiskirchen
Novex, San Diego, USA

Mikroskope

Axiovert 25
Axioplan 2

Zeiss, Jena
Zeiss, Jena

Zentrifugen

Biofuge fresco	Heraeus, Düsseldorf
Biofuge 28 RS	Heraeus, Düsseldorf
Varifuge 3.0 R	Heraeus, Düsseldorf
Optima L-70K Ultracentrifuge	Beckman Instruments, München

Waagen

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

Wasserbäder

Wasserbad 7	Memmert, Schwalbach
Schüttelwasserbad 1086	GFL, Burgwedel
PharmaciaLKB-MultiTemp II	Pharmacia-LKB, Freiburg

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

Cryo Vials (Einfrierröhrchen)	Greiner, Solingen
GEL-Blotting-Papier GB 002	Schleicher & Schuell, Dassel
Immobilon-P Transfer Membranes	Millipore, Bedford
Mehrfachkulturplatten	Greiner, Solingen
Mikroliterpipetten	Eppendorf, Hamburg
Objektträger	Engelbrecht, Edermünde
PCR-Röhrchen	Greiner, Solingen
Petrischalen	Greiner, Solingen
Probenröhrchen 15 bzw. 50 ml	Greiner, Solingen
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg & Greiner, Solingen
Polysterolreaktionsgefäße	Greiner, Solingen
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Whatman 3MM-Papier	Whatman Ltd, England
Zellkulturflaschen	Greiner, Solingen
Ultra-Clear Centrifuge Tubes (Zentrifugationsröhrchen)	Beckman Instruments, München

2.1.6 Enzyme

Restriktionsenzyme

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

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

2.1.7 Nukleinsäuren

Vektoren

pGEM-T (Klonierungsvektor)	Promega, Mannheim
pGEM-T Easy (Klonierungsvektor)	Promega, Mannheim
pEGFP-1	Clontech, Heidelberg
pSEAP2basic	Clontech, Heidelberg
pBacMam2 (Expressionsvektor)	Novagen, Madison, USA

Nukleotide, Primer

dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Roche, Mannheim
------------------------	-----------------

PCR-Primer wurden von der Firma Carl Roth, Karlsruhe synthetisiert.

SEAP-Not I-fw-Primer:

5'-GCT AGC GGC CGC CGC ATG CTG CTG CTG CTG CTG CTG-3'

SEAP-Not I-bw-Primer:

5'-CCT AGC GGC CGC TCA TGT CTG CTC GAA GCG GCC GGC CGC CCC GAC
CCT AGA GTA ACC-3'

gDpro-Sph I-fw-Primer:

5'-GCG CGC ATG CGG ATC CCC TGC GTC GTA CGT GCC GC-3'

gDpro-Bgl II-bw-Primer:

5'-GGC CAG ATC TAC CGG AAC GCA CCA CAC AAA A-3'

gDproT7-Bgl II-bw-Primer:

5'-GGC CAG ATC TTC CCT ATA GTG AGT CGT ATT AAT GAC CGA ACA ACT
CCC TAA C-3'

UL35 Bgl II-fw-Primer:

5'-GGC CAG ATC TAT GGC CGT CCC GCA ATT TCA CC-3'

UL35 Nco I-bw-Primer:

5'-GCG CCC ATG GGG GTC CCG GGC GTC GAA GG-3'

2.1.8 Molekulargewichtstandards

50 Base-Pair Ladder	Pharmacia Biotech, Freiburg
KiloBase™ DNA Marker	Pharmacia Biotech, Freiburg
RNA Molecular Weight Marker I	Roche, Mannheim
Broad Range Prestained SDS-Page Standards	Bio-Rad, München

2.1.9 Bakterienstämme

E.coli JM 109	Promega, Mannheim
E.coli DH5α	GibcoBRL, Eggenstein
E.coli DM1	GibcoBRL, Eggenstein

2.1.10 Medien für die Bakterienkultur

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

2.1.11 Zelllinien

HeLa-Zellen	V.I.V.A, Köln
Vero-Zellen	Vircell, S.L., Granada, Spanien
MRC-5-Zellen	Vircell, S.L., Granada, Spanien

Sf9-Zellen	Novagen, Madison, USA
Sf21-Zellen	V.I.V.A, Köln

2.1.12 Medien und Medienzusätze für die Zellkultur

Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom KG, Berlin
Gentamycin	GibcoBRL, Eggenstein
L-Glutamin	Biochrom KG, Berlin
Minimal Essential Medium (MEM)	Biochrom KG, Berlin
Opti MEM I-Medium	GibcoBRL, Eggenstein
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) (ohne Calcium- und Magnesiumsalze)	Biochrom KG, Berlin
Penicillin/Streptomycin	GibcoBRL, Eggenstein
Sf 900 II SFM	GibcoBRL, Eggenstein
T.C.100	GibcoBRL, Eggenstein
Trypsin-EDTA	Biochrom KG, Berlin

2.1.13 Antikörper

Maus anti-GFP-IgG, monoklonal	Clontech, Heidelberg
Ziege anti-Kaninchen-IgG, biotinyliert	Dianova, Hamburg

2.1.14 Puffer und Lösungen

Citrat-Puffer pH 3.0	NaCl 135 mM KCl 10 mM Zitronensäure 40 mM mit 1 M NaOH auf pH 3.0 titriert
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 7,4/7,6 1 mM EDTA pH 8,0
TlowE	10 mM Tris/HCl pH 7,4/7,6 0.1 mM EDTA pH 8,0
Agarosegel	Agarose (NuSieve 3:1 bzw. Seakem GTG) 0,8-3% TBE-Puffer

DEPC-Wasser (für Arbeiten mit RNA)	Aqua ad injectabilia+ 0,1% DEPC (Diethylpyrocarbonat)
TBE-Puffer	45 mM Tris 45 mM Borsäure 1 mM EDTA pH 8,0
Ethidiumbromid-TBE-Puffer-Lösung	20 µg EtBr 1000 ml TBE-Puffer
Probenpuffer (für Agarosegele)	10% Saccharose 0,2% Xylencyanol 0,2% Bromphenolblau
10 x Laufpuffer für RNA-Formaldehyd- Agarosegelelektrophorese	200 mM MOPS (freie Säure) 50 mM Na-Acetat 10 mM EDTA pH 7.0
5 x RNA-Probenpuffer für Formaldehyd- Agarosegele	4 ml 10 x Formaldehyd-Laufpuffer 2 ml Glycerol 3,084 ml Formamid 80 µl 0,5 M EDTA, pH 8,0 16 µl gesättigte wässrige Brom- phenolblaulösung 720 µl 37% Formaldehyd

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Präparation von Plasmid-DNA

Die Plasmidpräparation wurde entsprechend Herstellerangaben mit kommerziellen Kits durchgeführt. Für die Isolierung von kleineren DNA-Mengen aus 3-5ml Bakterienkultur wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Für die Präparation von größeren DNA-Mengen wurde das Plasmid Midi Kit von Qiagen mit Anionen-Austauscher-Säulen verwendet.

2.2.1.2 DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Die zu schneidende DNA wurde in einem Reaktionsansatz von 10-30µl mit Restriktionsenzymen meist bei 37°C für 1-4h inkubiert. Die Zahl der Enzymeinheiten richtete sich nach der Menge der zu spaltenden DNA. Die Reaktionspuffer wurden entsprechend den Herstellerempfehlungen gewählt. Nach dem Verdau wurde die Restaktivität von Restriktionsenzymen durch Agarosegelelektrophorese oder Hitzedenaturierung bzw. affinitätschromatographische Reinigung über das PCR Purification Kit (Qiagen) inaktiviert.

2.2.1.3 DNA-Agarosegelelektrophorese und Fragmentelution

Zur Analyse oder zur präparativen Isolierung wurden die DNA-Fragmente mittels Elektrophorese in horizontalen Agarosegelen aufgetrennt. Die analytische Auftrennung erfolgte meistens bei höherer Voltzahl (150-200V) und in Ethidiumbromid-haltigem (0,02µg/ml) TBE-Puffer. Anschließend wurden die aufgetrennten Ethidiumbromid-Nukleinsäure-Komplexe durch Anregung mit UV-Licht (366nm) visualisiert.

Die Auftrennung der zu isolierenden DNA-Fragmente erfolgte bei niedriger Voltzahl (max. 100V) und ohne Ethidiumbromid in TBE-Puffer. Die äußere Proben tasche wurde mit DNA-Größenstandard beladen. Die benachbarte Tasche enthielt einen kleinen Teil der zu gewinnenden DNA-Fragmente als Orientierungshilfe für das spätere Ausschneiden des ungefärbten Hauptteils der Fragmente. Die nächste Tasche wurde freigelassen und in die folgenden Taschen wurde der größte Anteil der Probe aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde der Bereich mit Laufspuren von DNA-Größenstandard

und Orientierungshilfe mit einem sterilen Skalpell abgetrennt und im Ethidiumbromidbad ($0,02\mu\text{g/ml}$) angefärbt. Anschließend wurde die Position der gefärbten DNA-Fragmente unter UV-Licht bestimmt und markiert. Die ermittelte Position wurde auf die Laufspuren mit ungefärbten DNA-Fragmenten übertragen und die entsprechenden Stellen mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelstückchen erfolgte unter Verwendung des Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers.

2.2.1.4 RNA-Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese

Zur Analyse wurden die RNA-Fragmente mittels Elektrophorese in horizontalen Formaldehyd-Agarosegelen aufgetrennt. Der 10x Formaldehyd-Agarosegel-Elektrophoresepuffer (FA-Puffer) wurde mit DEPC-Wasser auf einfache Konzentration verdünnt, mit 37%igem Formaldehyd versetzt (20 ml/l) und als Laufpuffer verwendet. Wenn die Darstellung der aufgetrennten Proben mittels UV-Licht erfolgen sollte, wurde dem Laufpuffer zusätzlich Ethidiumbromid hinzugefügt ($0,04\ \mu\text{g/ml}$). Für die Herstellung von Agarosegelen wurde Seakem GTG-Agarose (0,8%) im 1x-FA-Puffer ohne Formaldehyd aufgelöst und bis zum Schmelzen erhitzt. Kurz vor Erreichen der Gießtemperatur wurde der Agaroselösung (100ml) $1,8\text{ ml}$ 37%iges Formaldehyd zugegeben, sorgfältig gemischt und anschließend die Gele gegossen. Vor dem Auftragen von Proben wurden die Gele 30 min in 1x-FA-Puffer + Formaldehyd bei einer Voltzahl von 3 V/cm (24 V) äquilibriert (Präelektrophorese). Die RNA-Proben wurden mit 5x-RNA-Probenpuffer im Verhältnis 4+1 gemischt, für $3\text{-}5\text{ min}$ auf 65°C erhitzt und nach kurzem Abkühlen auf Eis auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte mit einer Voltzahl von $5\text{-}7\text{ V/cm}$ (56 V) für $2\text{-}3\text{ h}$. Die Darstellung der aufgetrennten RNA erfolgte meist mittels Direktfärbung mit Ethidiumbromid im Laufpuffer und durch die anschließende Anregung der Ethidiumbromid-RNA-Komplexe mit UV-Licht (366nm).

2.2.1.5 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Nach singulärem Restriktionsverdau besitzt die linearisierte Vektor-DNA endständige 5'-Phosphatreste, die die Religationswahrscheinlichkeit der Plasmid-DNA während des Ligationsansatzes stark erhöhen. Durch Entfernung dieser Phosphat-Gruppen mittels der alkalischen Phosphatase (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP)) ließ sich die

Religation der Plasmide relativ niedrig halten. Die DNA wurde 1h bei 37°C mit CIAP inkubiert. Anschließend wurde die verbliebene Phosphataseaktivität durch Erhitzen auf 75°C (10min) und gegebenenfalls Aufreinigung (PCR-Purification Kit) inaktiviert.

2.2.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Verknüpfung eines Vektors mit den zu klonierenden DNA-Fragmenten wurde durch T4-DNA-Ligase katalysiert. Für einen Reaktionsansatz wurden ca. 20ng der gespaltenen und dephosphorylierten Vektor-DNA mit einem 3-fachen molaren Überschuss an zu inserierenden DNA-Fragmenten und 1x Ligase-Puffer in einem Reaktionsvolumen von 20µl zusammengebracht. Anschließend wurde 1U T4-DNA-Ligase hinzugegeben und in einem Wasserbad bei 16°C über Nacht inkubiert.

2.2.1.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Aufreinigung der PCR-Produkte

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion wurden definierte DNA-Bereiche amplifiziert. Ein Reaktionsansatz wurde zusammengestellt aus je 0,5µM Primer, ca. 100ng Zielsequenz, 0,4mM Oligonukleotid-Mix (dNTPs), 1x PCR-Puffer (siehe Pufferliste in Material) und 2,5 U Taq-Polymerase in 50µl Endvolumen. Die Reaktionsansätze wurden für 20 Amplifikationszyklen im Thermocycler GeneAmp® PCR System 9700 (Perkin-Elmer, Überlingen) inkubiert. Ein Amplifikationszyklus setzte sich aus folgenden Schritten zusammen: 30s Denaturierung bei 95°C (im 1. Zyklus 10min), 30s Primer-Anlagerung bei errechneter Anlagerungstemperatur und 1,5min DNA-Synthese bei 72°C (im letzten Zyklus 10min). Nach der Amplifikation wurden die PCR-Reaktionsansätze mittels Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) gemäß den Herstellerangaben gereinigt.

2.2.1.8 *in vitro*-Transkription

Die *in vitro*-Transkription ermöglicht unter Verwendung entsprechend aufbereiteter Zellextrakte eine zellfreie mRNA-Synthese. Für die Herstellung von Transkripten benötigt man einen Vektor, der einen Promotor für eine phagencodierte DNA-abhängige RNA-Polymerase trägt und in den die zu transkribierende DNA hinter diesen Promotor inkloniert werden kann. Die RNA-Polymerase transkribiert spezifisch die inklonierte DNA-Sequenz „downstream“ vom Promotor und synthetisiert in Gegen-

wart von Ribonucleosidtriphosphaten und Mg^{2+} den +RNA-Strang (32). Bei Einsatz von einem oder mehreren radioaktiv (z.B. mit ^{32}P , 3H oder ^{35}S) oder nicht-radioaktiv (z.B. mit Digoxigenin oder Biotin) markierten Ribonucleosidtriphosphaten werden spezifisch markierte Transkripte erhalten. Die hergestellten Transkripte können anschließend als hochspezifische Gensonde u.a. für Hybridisierungen von Northern Blots und Southern Blots oder bei *in situ*-Hybridisierungen eingesetzt werden. Um Transkripte definierter Länge zu erhalten, wird die Template-DNA vor der Transkriptionsreaktion mit einem geeigneten Restriktionsenzym linearisiert. Die Transkripte können auch durch Elektrophorese im Agarosegel (Formaldehyd-Gel) und Ethidiumbromid-Färbung analysiert werden.

In dieser Arbeit wurde der Promotor für die RNA-Polymerase des T7-Bakteriophagen benutzt. Der T7-Promotor wurde zusammen mit dem HSV-1 gD-Promotor in pBacMam2SEAP einkloniert (siehe Konstruktion von Transfervektoren und Tab. 4.1). Für die *in vitro*-Transkription benötigte Reagenzien wurden dem DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) (Fa. Roche) entnommen und der Reaktionsansatz nach dem mitgelieferten Herstellerprotokoll durchgeführt. Anschließend wurden die Transkripte durch Elektrophorese im Formaldehyd-Agarosegel und Ethidiumbromid-Färbung analysiert.

2.2.1.9 Transformation von Bakterien

Für jeden Transformationsansatz wurden 50µl transformationskompetente Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 5-10µl eisgekühltem Ligationsansatz gemischt. Nach 30min Inkubation auf Eis wurden die Ansätze für 2min einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt. Danach wurden die Zellen für ca. 5min auf Eis abgekühlt und in 0,9ml antibiotikafreiem SOC-Medium aufgenommen. Die darauffolgende Inkubation für 1h bei 37°C diente dem Aufbau einer Antibiotikaresistenz, so dass die Zellen zur Selektion von erfolgreich transformierten Bakterienklone auf antibiotikahaltige LB-Agarplatten ausgestrichen werden konnten. Nach Kultivierung übernacht bei 37°C wurden gut begrenzte Einzelkolonien in 5ml antibiotikahaltiges LB-Medium übertragen und über Nacht im Schüttelwasserbad bei 37°C inkubiert.

2.2.2 Zellkulturtechniken

2.2.2.1 Vero-, MRC-5 und HeLa-Zellen Stammhaltung

Die Zellen wurden in Gewebekulturflaschen unter Standardbedingungen bei 37°C im CO₂-Begasungsbrutschrank kultiviert (2x). Das verwendete Minimum Essential Medium (MEM) wurde mit 2-10% Komplement-inaktiviertem FCS (45min, 56°C), 100U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin und nicht essentiellen Aminosäuren (Biochrom) ergänzt. Die Zellen wurden zumeist zweimal in der Woche passagiert. Dazu wurde das Medium entfernt und verworfen, der adhärente Zellrasen mit PBS gewaschen und die Zellen mit 0,05% Trypsin in PBS 0,02% EDTA abgelöst. Die Zellsuspension wurde dann im Verhältnis 1:3 bis 1:7 in Gewebekulturflaschen mit frischem Kulturmedium umgesetzt.

2.2.2.2 Transfektion der Säugerzellen

Das Prinzip der beiden hier verwendeten Transfektionsreagenzien FuGENE6 (Roche) und LipofectAMINE 2000 (GibcoBRL) beruht auf der Lipofektion (35). Auf Grund ihrer positiver Ladung komplexieren die in Reagenzien enthaltenen Lipide sehr effektiv mit DNA. Diese Komplexe fusionieren mit der Zelloberfläche, bringen somit die DNA in das Zellinnere und anschließend findet die Expression der eingeschleusten Gene im Zellkern bzw. im Cytoplasma statt. Die zu transfizierenden Zellen wurden in 24-Loch-Platten mit Zellkulturmedium ohne Antibiotika ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 50-80% inkubiert.

Nach Herstellerangaben wurden für die FuGENE6-Transfektion jeweils 3µl FuGENE6 Reagenz zu 97 µl serumfreiem Kulturmedium tröpfchenweise hinzugegeben und vorsichtig gemischt. Zu dieser Lösung wurden dann 1-2 µg Plasmid-DNA hinzugefügt, vorsichtig gemischt und für 45min bei RT inkubiert. Danach wurden die Transfektionsansätze auf die mit 0,5 ml Medium inkubierten Zellen gegeben, die Zellkulturplatten leicht geschwenkt und bis zur Probenabnahme bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Für die Transfektion mit LipofectAMINE 2000 wurden ebenfalls den Herstellerangaben entsprechend 0,8-1,2 µg DNA in 50 µl Medium (Opti-MEM II, GibcoBRL) ohne Serum gegeben. In Parallelansätzen wurden 3 µl LipofectAMINE 2000 Reagenz in 50 µl Opti-MEM II Medium verdünnt und anschließend zu den hergestellten DNA-Lösungen

hinzugegeben. Nach 30 min Inkubation bei RT wurden die Transfektionsansätze auf die mit 0,5 ml Medium inkubierten Zellen gegeben, die Zellkulturplatten leicht geschwenkt und bis zur Probenabnahme bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.2.2.3 Baculovirus-Transduktion von Säugerzellen

Die Transduktion von Zellen erfolgte in 6- bzw. 24-Loch-Platten. Nach dem Aussäen wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 80-100% inkubiert. Für die Transduktion wurde meistens eine m.o.i. von 200 p.f.u./Zelle gewählt und die dazu notwendige Verdünnung von Virusstammlösung mit MEM (mit allen Zusätzen für die Zellkultur) durchgeführt. Die verdünnten Virusinokula wurden auf die Zellen gegeben und für 2h bei 37°C im CO₂-Brutschrank inkubiert. Bei kleinvolumigen Virusinokula wurden die Platten während der Inkubation mehrmals geschwenkt. Nach der Inkubation wurde die Virussuspension abgenommen und durch frisches Zellkulturmedium ersetzt. Die Zellen wurden bis zur Probenentnahme bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.2.2.4 Infektion der Zellen mit HSV-1

Die zu infizierenden Zellen befanden sich zumeist in 6- bzw. 24-Loch-Kulturplatten. Für die Infektion benötigte, tiefgefrorene Virusstammlösungen wurden bei RT aufgetaut und mit serumfreiem Medium auf die gewünschte Konzentration gebracht. Die Zellen wurden mit einer m.o.i. (*multiplicity of infection*) von 5-15 p.f.u./Zelle (*plaque forming units*, infektiöse Viruspartikel pro Zelle) infiziert. Dazu wurde das Kulturmedium abgezogen und der Zellrasen mit PBS gewaschen. Anschließend wurde Medium mit der errechneten Virusmenge auf die Zellen gegeben und für 1h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Inokulum abgezogen, die Zellen mit frischem Kulturmedium bedeckt und bis zum gewünschten Zeitpunkt unter Standardbedingungen inkubiert.

2.2.2.5 Kultivierung von Insektenzellen

Die verwendeten permanenten Zelllinien Sf9 (Novagen) und Sf21 sind Klone aus IPLB-Sf21-AE-Zellen, die aus Ovarien-Gewebe der Insektenart *Spodoptera frugiperda* gewonnen wurden. Sf9- und Sf21- Zellen benötigen keine kontrollierte CO₂-haltige Atmosphäre und werden bei 28°C kultiviert. Die Zellen weisen eine Verdopplungszeit von 20-30 Stunden in TC-100-Medium (GibcoBRL) auf, das 10% foetales Kälberserum

und Gentamicin (50µl/ml) enthält. Beide Klone wachsen sowohl adhärent als auch in Suspensionskultur.

2.2.2.6 Passagieren von Insektenzellen

Die Zellen wurden adhärent in Flaschen kultiviert und ließen sich gut zum Passagieren durch Abspülen mit einer 10ml-Pipette vom Flaschenboden ablösen. Nach anschließender Vereinzelnung durch Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen in neue Kulturflaschen portioniert. Für eine genaue Aufteilung wurden die Zellen vorsichtig pelletiert, in frischem Medium resuspendiert und ihre Anzahl mit Hilfe der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden etwa alle 4 Tage passagiert.

2.2.3 Baculovirus-System

2.2.3.1 Herstellung von rekombinanten Baculoviren

Zur Konstruktion rekombinanter Baculoviren wurde der BacVector-1000 bzw. 3000 DNA Kit (Novagen) verwendet. Die im Kit gelieferte Baculovirus-DNA ist durch dreifachen Verdau mit Restriktionsendonukleasen linearisiert und durch Deletion eines essentiellen Fragments (ORF 1629) modifiziert. Diese letale Deletion wird in einem Kotransfektions-Ansatz mit ORF 1629-tragendem Transferplasmid durch homologe Rekombination überwunden. Die Rekombinationseffizienz dieses Verfahrens liegt bei 85-99%, so dass die meisten entstehenden Viren den Plasmid-Vektor mit kloniertem Gen enthalten (59).

Für die Kotransfektion werden max. 500ng reiner Plasmid-DNA, 0,5µg BacVector 1000 bzw. 3000 Triple Cut Virus DNA, Sf9-Zellen, Eufectin Transfection Reagent und auf 27°C vortemperiertes Insektenzellmedium mit bzw. ohne FCS und Antibiotika benötigt. 3×10^6 Zellen wurden in einer 25 cm² Kulturflasche ausgesät und für mindestens eine Stunde im Brutschrank bei 28°C zum Sedimentieren inkubiert. In der Zwischenzeit wurden ca. 500ng Transfervektor-DNA mit 100ng Virus-DNA gemischt und mit Medium ohne FCS und Antibiotika auf 25µl Endvolumen aufgefüllt. In einem Parallelansatz wurden 5µl Eufectin Reagent mit 20µl aqua bidest., das in einem Polyesterolreaktionsgefäß vorgelegt wurde, inkubiert. Die Transfervektor/Virus-DNA-Mischung wurde dann zu dem verdünnten Eufectin Transfection Reagent hinzugegeben, vorsichtig gemischt und für 15min bei RT inkubiert. Währenddessen wurden die Zellen zweimal

mit ca. 2ml Medium ohne FCS und Antibiotika gewaschen und mit 1ml des gleichen Mediums bedeckt. Nach der Inkubation wurde das Reaktionsgemisch mit Medium ohne FCS und Antibiotika auf 0,5 ml Endvolumen aufgefüllt und langsam auf die Zellen gegeben. Das Endvolumen von 1,5 ml wurde gut über den Zellrasen verteilt und der Versuchsansatz für 1h bei RT inkubiert. Um eine bessere Verteilung der Transfektionsreagenzien zu erreichen und das Austrocknen der Zellen zu vermeiden, wurde die Zellkulturflasche jede 15min vorsichtig geschwenkt. Anschließend wurden 6ml Medium mit FCS und Antibiotika zugegeben. Nach 5-7 Tagen Inkubation bei 27°C wurde der Zellkulturüberstand abgenommen, durch Zentrifugation bei 1000 x g von Zellresten getrennt und zur Virusamplifikation auf zwei 25cm² Kulturflaschen verteilt. Nach 2-facher, gegebenenfalls 3-facher Virusamplifikation wurde die Expression des klonierten Gens überprüft. Bei erfolgreicher Genexpression wurden die rekombinanten Viren mittels Plaque-Assay klonal aufgereinigt.

2.2.3.2 Klonale Aufreinigung bzw. Bestimmung des viralen Titers mittels Plaque-Assay

Die Sf9-Zellen wurden auf 6-Well-Platten ausgesät und bis zu 50-60%-iger Konfluenz inkubiert. Eine Verdünnungsreihe wurde aus dem Virus-Überstand nach dem Transfektionsansatz mit dem Verdünnungsfaktor 10 in Antibiotika-haltigem Insektenzellmedium ohne FCS angelegt und 1h bei RT mit Sf9-Zellen in 6-Well-Platten inkubiert. Währenddessen wurde 1%-ige (w/v) Agaroselösung hergestellt. Dazu wurde 0,5g AgarPlaque Agarose (PharMingen) in 25ml Protein-free Insect Medium (PharMingen) durch mehrmaliges Erhitzen bis zum Sieden aufgelöst und auf 45°C im Wasserbad abgekühlt. Zur abgekühlten Agaroselösung wurden 25ml auf RT vortemperiertes Insektenzellmedium mit FCS und Antibiotika hinzugefügt und gut gemischt. Die Virusinokula wurden restlos aus den Kavitäten abgezogen und die Zellen mit 3-4ml Medium/Agarosemischung pro Well überschichtet. Anschließend wurden die Platten bis zum Aushärten der Agarose-Deckschicht ca. 30min bei RT inkubiert und nicht bewegt. Um eine Austrocknung der Zellen zu vermeiden, wurde die Agaroseschicht mit 1-2ml Medium benetzt. Nach 6-9 Tagen Inkubation bei 27°C wurden die Plaques gezählt bzw. für die Aufreinigung gepickt. Zum Picken wurden runde, gut begrenzte Einzelplaques markiert und durch Ausstanzen der darüberliegenden Agaroseschicht mit einer Eppendorff-Pipettenspitze entnommen. Das virushaltige Agarosestückchen wurde in

1ml Medium ohne FCS über Nacht bei 4°C auf dem Schütteltisch inkubiert. Die Virussuspension wurde anschließend für weitere Plaque-Assays bzw. Virusamplifikationen eingesetzt.

2.2.3.3 Infektion von Insektenzellen und Amplifikation rekombinanter Baculoviren

Die Virusamplifikation erfolgte in 75cm² Zellkulturflaschen, die einen subkonfluenten Insektenzellrasen enthielten. Das Kulturmedium wurde abgezogen und die Zellen mit einem Baculovirus-Überstand (2-4ml) mit niedrigem Titer (m.o.i. < 1) für 1h bei RT infiziert. Danach wurde frisches Medium hinzugegeben und die Zellen für 4-7 Tage bei 27°C inkubiert. Der Überstand mit infektiösen Viruspartikeln wurde durch Abzentrifugation der Zellreste bei 1000 x g für 5min gereinigt und bis zur Titerbestimmung bei 4°C aufbewahrt. Bei nicht ausreichender Titerhöhe wurde zusätzlich eine Aufkonzentrierung mittels Ultrazentrifugation durchgeführt. Bei ausreichender Titerhöhe wurde die Virusernte in kleinere Volumina aufgeteilt und bei -80°C gelagert. Vor dem Gebrauch der tiefgefrorenen Virusstocks wurde eine weitere Titerbestimmung durchgeführt.

2.2.3.4 Aufkonzentrierung der Viruspartikel

Die Herstellung von Virusstocks mit hohem Titer ($> 1 \times 10^8$) erfolgte mittels Ultrazentrifugation (Optima L-70K Ultracentrifuge, Beckman Instruments). Zellkultur-Überstand wurde zunächst durch Zentrifugation bei 10000 x g und 4°C für 10min von Zellresten geklärt und in Ultrazentrifugations-Röhrchen (Beckman SW28 Rotor) pipettiert. Die Virussuspension wurde mit ca. 3ml 25%iger (w/v) Rohrzuckerlösung in PBS unterschichtet und für 2h bei 24000U/min und 4°C zentrifugiert. Das Virus-Pellet wurde in PBS unter vorsichtigem Schütteln über Nacht bei 4°C resuspendiert. Die PBS-Menge stand im Verhältnis 1:50 zum Ausgangsvolumen (Pellet aus 10ml unkonzentriertem Überstand wurde in 200µl PBS aufgenommen). Nach der Aufkonzentrierung wurden die Virus-Stocks bei -80°C gelagert.

2.2.4 Techniken zur Proteindetektion

2.2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die durchgeführten Protein-Gelaufentrennungen wurde das NuPAGE-Elektrophorese-System (Novex) verwendet. Die Proteinproben wurden aus transfizierten bzw.

transduzierten und gegebenenfalls mit HSV infizierten Zellen gewonnen. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, mit einem Zellschaber vom Untergrund abgelöst und bei 10000 x g für 4min zentrifugiert. Die Pellets wurden in 50-100µl 1x NuPAGE SDS-Probenpuffer mit Reducing Agent resuspendiert und für 10min auf 70°C erhitzt. Von auf RT abgekühlten Proben wurden jeweils 10µl auf das fertig gelieferte 10%-ige SDS-Polyacrylamid-Gel (Novex) aufgetragen, die Elektrophoresekammer (XCell II, Novex) nach Angaben des Herstellers mit dem Laufpuffer gefüllt und die Proteinauftrennung bei 200V und 150 mA für ca. 35min durchgeführt.

2.2.4.2 Western Blot

Unmittelbar nach Abschluß der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgte der elektrophoretische Transfer der aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine proteinbindende PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran (Immobilon-P, Millipore). Der Proteintransfer erfolgte bei 25V und 155mA für 1h in dem XCell II Blot Module (Novex), das den Herstellerangaben entsprechend zusammengesetzt wurde. Um die überschüssigen Proteinbindestellen abzusättigen und eine unspezifische Bindung der Antikörper zu vermeiden, wurde die Membran nach dem Blotten für 1h bei RT in Blocklösung (1% (w/v) Milchpulver in PBS) auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Blocklösung entfernt und der Erstantikörper (1:500 in PBS, 3% BSA, 0,05% Thiomersal verdünnt, die Lösung wurde auch für folgende Verdünnungen und Waschschrte benutzt) über Nacht bei RT auf die Membran gegeben. Durch dreimaliges Waschen für jeweils 5min wurden die nicht gebundenen Antikörper entfernt. Der Biotin-gekoppelte Zweitantikörper (Biotin-SP-conjugated F(ab')₂ goat-antimouse IgG, Calbiochem) wurde 1:1000 verdünnt und für 1h bei RT mit der Membran auf dem Schüttler inkubiert. Es folgten das Waschen wie nach Zugabe des ersten Antikörpers, die Inkubation mit 1:1000 verdünnter Streptavidin-Peroxidase für 45min und abschließende Waschschrte (2 mit PBS/BSA/Thiomersal, 1 mit PBS). Zur Visualisierung der von spezifischen Antikörpern erkannten Proteinbanden wurde der Blot mit Substratlösung (PBS, 10% Methanol, 0,03% (w/v) 4-Chloronaphthol 0,03% (w/v) H₂O₂) entwickelt. Die Farbreaktion wurde durch Waschen mit aqua bidest. gestoppt und die feuchte Membran zwischen saugfähigen Filterpapieren (Whatman 3MM, Whatman Ltd) getrocknet.

2.2.4.3 Fluoreszenzmikroskopie

Die für eine Transfektion bzw. Transduktion mit den EGFP-tragenden Vektoren und anschließende Detektion der EGFP-Autofluoreszenz ausgewählten Säugerzellen wurden in 24-Loch-Platten mit Deckgläschen auf dem Boden ausgesät. Die transfizierten/transduzierten und gegebenenfalls HSV-überinfizierten Zellen wurden nach definierten Inkubationszeiten zweimal mit PBS gewaschen und mit 5%-igem Formaldehyd für 10min bei RT fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Deckgläschen aus den Platten-Vertiefungen entnommen und auf einem Objektträger mit der Zellrasen-Seite nach unten in Glycerol/PBS-Lösung (9:1) mit 2,5%(w/v) DABCO (Sigma) eingebettet. Die Deckgläschen wurden am Rand mit Histofluid (Engelbrecht) an die Objektträger festgeklebt und die eingebetteten Zellen somit versiegelt. Anschließend wurde die zellfreie Seite der Deckgläschen mit aqua bidest. gewaschen. Die EGFP-Autofluoreszenz wurde mit einem Axioplan 2 Mikroskop (Zeiss) unter Verwendung eines FITC- oder EGFP-Filters ausgewertet und fotografisch dokumentiert.

2.2.4.4 SEAP (secreted alkaline phosphatase)-Aktivitätsmessung

Die SEAP-Aktivität wurde unter Verwendung des Great EscAPe SEAP Chemiluminescence Kits (Clontech) bestimmt. Dazu wurden jeweils 150µl der Zellkulturüberstände von transfizierten/transduzierten und gegebenenfalls HSV-überinfizierten Zellen nach definierten Inkubationszeiten abgenommen und durch Zentrifugation bei 10000 x g für 10sec. von Zellresten geklärt. 25µl der Kulturüberstände wurden zu 75µl Verdüpfungspuffer (1fach) gegeben und, um die zelleigene alkalische Phosphatase zu inaktivieren, für 30min auf 65°C erhitzt. Danach wurden die Ansätze 2-3min auf Eis gekühlt und mit 100µl Assay-Puffer gemischt. Nach 5min Inkubation bei RT wurden 100µl Substratlösung (Chemiluminescent Enhancer, 1,25mM CSPD Substrat) hinzugegeben, die Proben in Luminometer-Röhrchen überführt und 10min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die SEAP-Aktivität in den Proben mit dem Murex Luminometer (Murex Diagnostica) bei einer Messzeit von 10sec. bestimmt.

3. Ergebnisse

3.1 Konstruktion von Transfervektoren

pBacMam2SEAP

Die kodierende Sequenz von SEAP (*secreted alkaline phosphatase*) wurde aus dem Vektor pSEAP2-Basic (Clontech) per PCR mit Not I-Schnittstellen tragenden Primern (Tab. 4.1) amplifiziert und in pGEM-T Easy (Promega) zwischenkloniert. Anschließend wurde das SEAP-Fragment aus pGEM-T Easy in die NotI-Schnittstelle des Baculovirus-Transfervektors pBacMam2 (Novagen) unter CAG-Promotor (CMV *ie enhancer/chicken β-actin promoter*)-Kontrolle kloniert (Abb. 5). Die korrekte Orientierung des inserierten SEAP-Fragmentes wurde durch Verdau mit BamH I und Hind III überprüft.

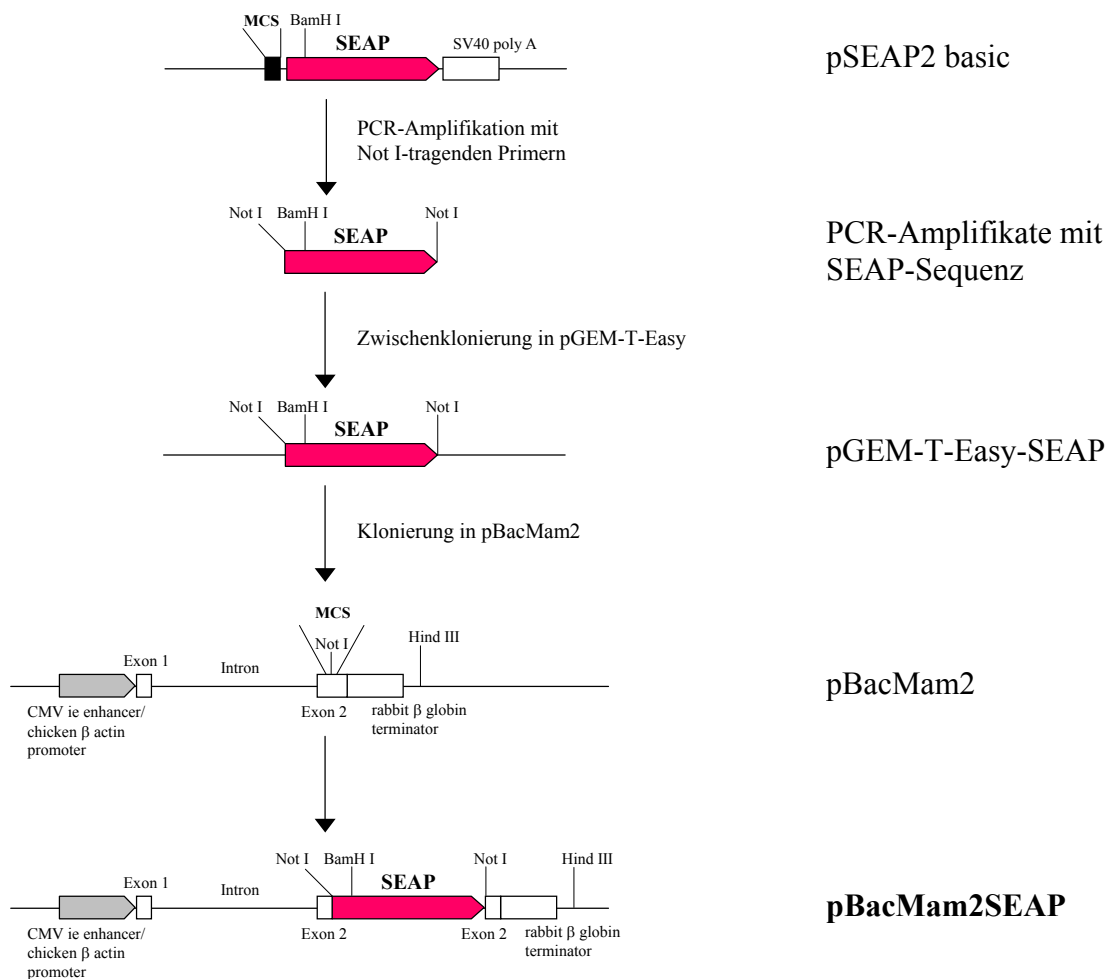


Abb. 5 Klonierungsschema des Plasmids pBacMam2SEAP

pBacMam2EGFP

Zur Klonierung der EGFP-kodierenden Sequenz in pBacMam2 wurde das EGFP-Fragment aus dem Vektor pEGFP-1 (Clontech) mit den Restriktionsendonukleasen BglII und Not I geschnitten und in mit den gleichen Enzymen geöffneten pBacMam2 einkloniert (Abb. 6). Das entstandene Plasmid pBacMam2EGFP enthielt somit EGFP als Genexpressionsmarker unter CAG-Promotor (CMV ie enhancer/chicken β -actin promoter)-Kontrolle.

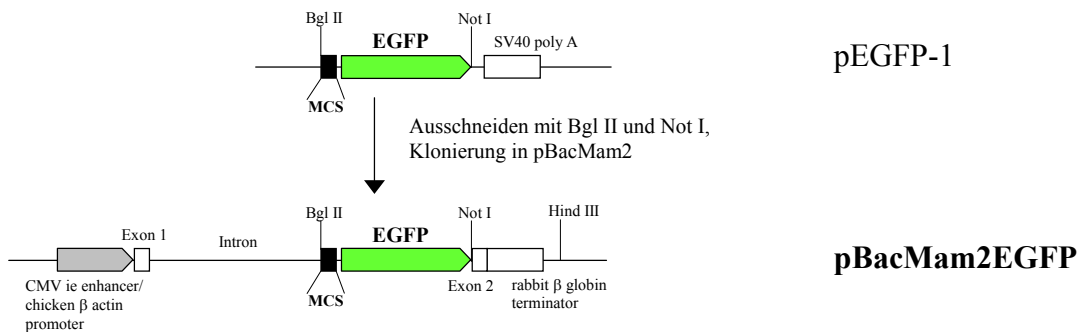


Abb. 6 Klonierungsschema des Plasmids **pBacMam2EGFP**

pBacMam2gDproSEAP und pBacMam2gDproT7SEAP

Für die Konstruktion von pBacMam2gDproSEAP (Abb. 7) wurde der HSV-1 gD-Promotor-Sequenzbereich (gDpro) von Position -392 bis +69 in Bezug auf die Initiationsstelle der Transkription von gD aus HSV-1-DNA (Stamm 17syn+) per PCR mit SphI- und BglII-Schnittstellen tragenden Primern (Tab. 3) amplifiziert und in pGEM-T (Promega) zwischenkloniert. Bei gDproT7 wurde der 5'-nichttranslatierte Bereich von Position +18 bis +69 deletiert und ein zusätzlicher T7-Promotor angefügt (Tab. 3). Anschließend wurde die Enhancer/Promotor-Region sowie der nichttranslatierte transkribierte Bereich zwischen den SphI/BglII-Schnittstellen von pBacMam2SEAP durch das SphI/BglII-gDpro-Fragment (bzw. gDproT7) aus pGEM-TgDpro (bzw. pGEM-TgDproT7) ersetzt.

pBacMam2gDproEGFP

Für die Klonierung von pBacMam2gDproEGFP (Abb. 7) wurde die SEAP-Sequenz zwischen den BglII- und NotI-Schnittstellen aus pBacMam2gDproSEAP durch ein BglII/NotI-EGFP-Fragment aus pEGFP-1 (Clontech) ersetzt.

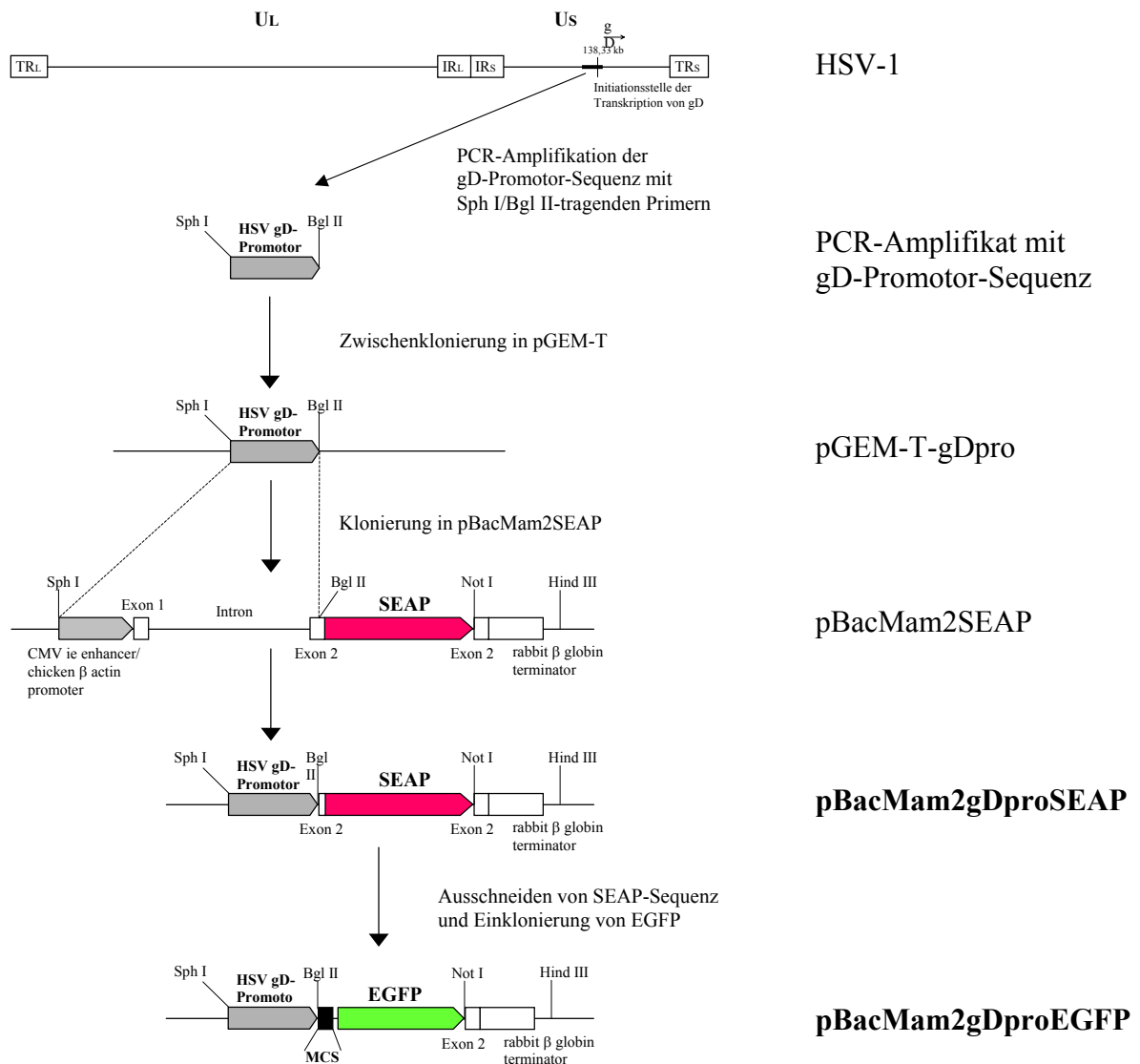


Abb. 7 Klonierungsschema der Plasmide **pBacMam2gDproSEAP** und **pBacMam2gDproEGFP**

pBacMam2gDproUL35EGFP und pBacMam2gDproUL35ECFP

Die Klonierung von UL35 und ECFP in den Ausgangsvektor pBacMam2gDproEGFP wurde von S. Wehmeier wie folgt durchgeführt. Der VP26-kodierende HSV-1 DNA-Sequenzbereich (UL35) (11) wurde beginnend vom Startkodon des VP26 (Position 70566 bis 70904) aus HSV-1-DNA (Stamm 17syn+) per PCR mit BglII- und NcoI-Schnittstellen tragenden Primern (Tab. 3) amplifiziert und in den Vektor pGEM-T Easy (Promega) zwischenkloniert. Aus dem Konstrukt pGEM-T Easy UL35 wurde das UL35-Fragment mit BglII und NcoI herausgeschnitten und in den mit gleichen Enzymen geöffneten Vektor pBacMam2gDproEGFP kloniert (Abb. 8). Durch die

Auswahl dieser beiden Enzyme (BglII und NcoI) wurde erreicht, dass die proteinkodierenden Teile der beiden Gene (UL35 und EGFP) im richtigen Leserahmen (*in frame*) miteinander verbunden wurden und sich als Fusionsprotein exprimieren ließen. Als Expressionsprodukt entstand das Fusionsprotein VP26EGFP, in dem das VP26 C-terminal das EGFP als Markierung (*tag*) trägt. Für die Klonierung von pBacMam2gDproUL35EGFP (Abb. 8) wurde die EGFP-Sequenz zwischen den NcoI- und NotI-Schnittstellen aus dem pBacMam2gDproUL35EGFP durch ein NcoI/NotI-EGFP-Fragment aus pEGFP-1 (Clontech) ersetzt.

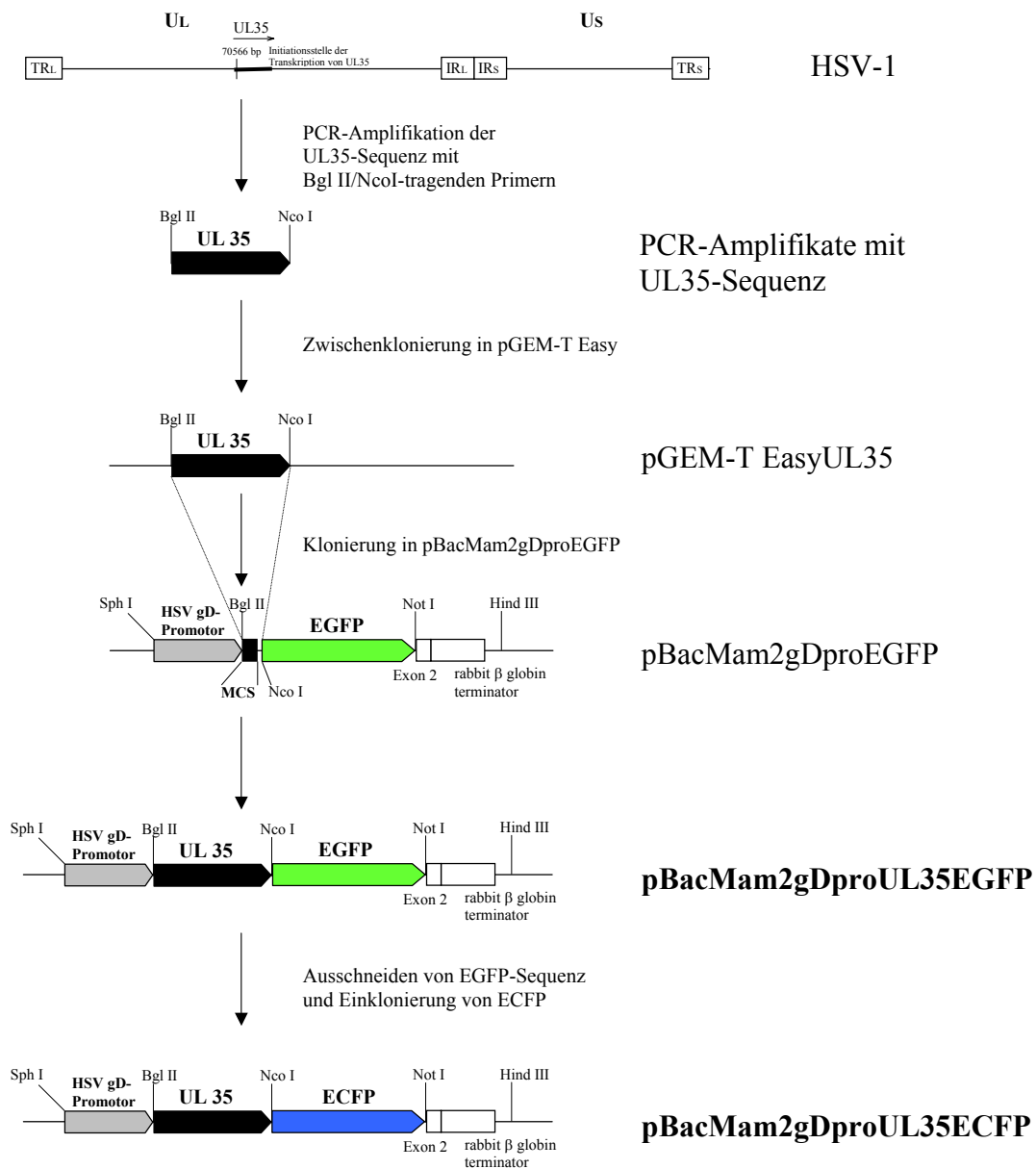
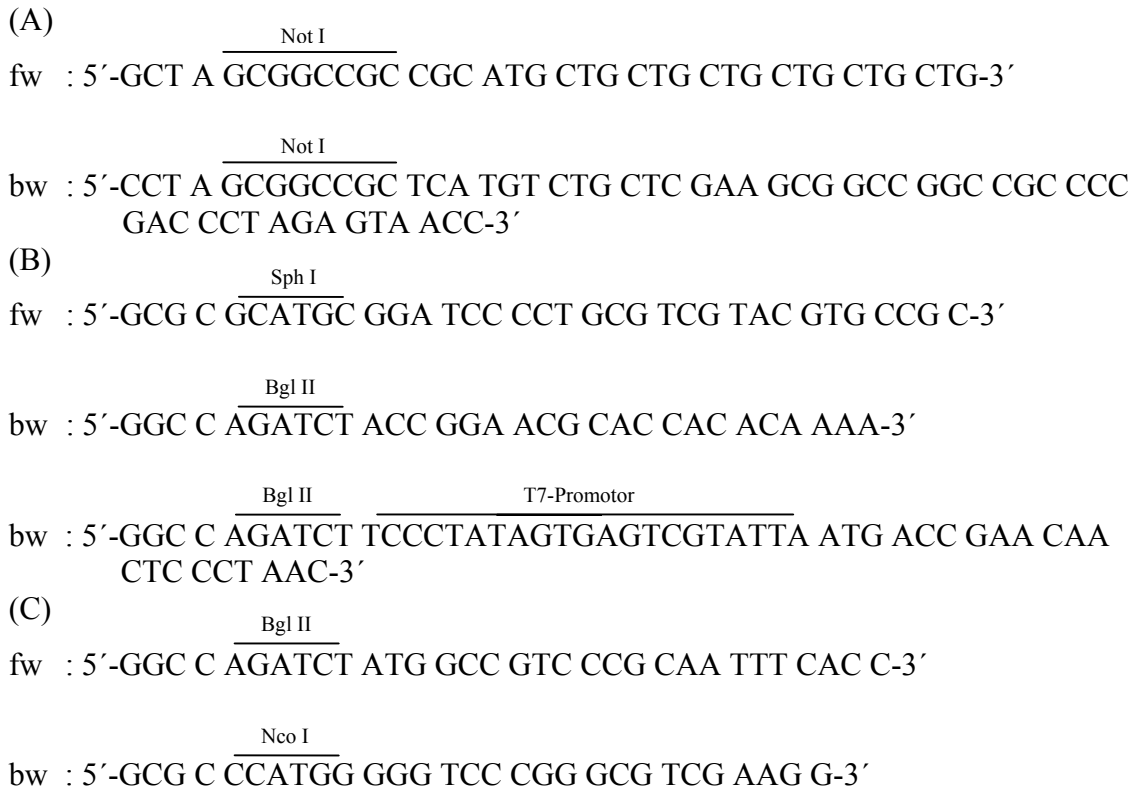


Abb. 8 Klonierungsschema der Plasmide pBacMam2gDproUL35EGFP und pBacMam2gDproUL35ECFP

Tab. 3 Sequenzen der PCR-Primer mit den Schnittstellen der für die Klonierungen verwendeten Restriktionsendonukleasen. (A) Primer-Paar für die SEAP-Amplifikation. (B) Primer für die HSV-1 gD-Promotor-Amplifikation. (C) Primer-Paar für die HSV-1 UL35-Amplifikation. (fw: Vorwärts-Primer, bw: Rückwärts-Primer)



3.2 Testung der T7-Promotor-Funktion

Für die Überprüfung der T7-Promotor-Funktion wurde pBacMam2gDproT7SEAP und pBacMam2gDproSEAP als Template-DNA bzw. Kontrollkonstrukt ausgewählt. Beide Konstrukte wurden vor der *in vitro*-Transkription unter gleichen Bedingungen mit der Restriktionsendonuklease Kpn I gespalten, um bei der Transkription Transkripte von ca. 1600 bp Länge zu erhalten. Die Restriktionsansatzprodukte wurden anschließend mit Hilfe des PCR-Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt und deren Konzentration überprüft. Von beiden Konstrukten wurden nach dem Herstellerprotokoll 0,5 µg DNA für die *in vitro*-Transkriptions-Reaktion eingesetzt. Nach Ablauf der Transkriptionsreaktion wurden die Produkte im Formaldehyd-Agarosegel bei 56 V aufgetrennt und auf ihre Größe in Bezug auf mit aufgetragenen RNA Molecular Weight Marker I (Fa.

Roche) analysiert (Abb. 9). Die Tasche der Spur 1 wurde mit dem RNA-Marker beladen. In die Tasche der Spur 2 wurde das Produkt aus dem Reaktionsansatz, in dem pBacMam2gDproT7SEAP als Template-DNA diente, geladen. Die dritte Spur erhielt das Produkt aus dem Reaktionsansatz mit pBacMam2gDproSEAP (\emptyset T7-Promotor) als Template-DNA. Die deutlich sichtbare Bande in der zweiten Spur liegt etwa auf der Höhe der 1517 bp großen Bande des RNA-Markers und entspricht somit der erwarteten Größe von rund 1580 bp. Die dritte Spur enthält keine Banden in dieser Höhe außer einer höher liegenden, sich schwach (im überbelichteten Bild) darstellenden Template-DNA Bande, was auf eine nicht stattgefundene Transkription in dem Ansatz ohne T7-Promotor hinweist. Durch diese Untersuchung konnte gezeigt werden, dass der T7-Promotor in dem Konstrukt pBacMam2gDproT7SEAP funktionell intakt ist.

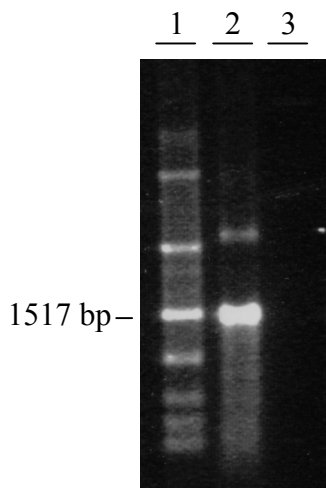


Abb. 9 Formaldehyd-Agarosegel-Elektrophorese der *in vitro*-Transkriptions-Produkte. RNA Molecular Weight Marker I (Spur 1); Produkt aus dem Reaktionsansatz mit pBacMam2gDproT7SEAP als Template-DNA (Spur 2); Produkt aus dem Reaktionsansatz mit pBacMam2gDproSEAP als Template-DNA (Spur 3).

3.3 Testung der HSV-1-gD-Promotoraktivität in HSV-infizierten Zellen

Die transiente Expression von SEAP über die Konstrukte pBacMam2SEAP und pBacMam2gDproSEAP und der Effekt einer HSV-Infektion auf die Expressionsstärke wurden in HeLa-Zellen ausgetestet. HeLa-Zellen wurden mit identischen DNA-Mengen beider Konstrukte unter Verwendung von FuGENE6 Transfection Reagent (Roche) transfiziert (*siehe Methoden*) und 4h nach Transfektion mit HSV-1 überinfiziert (*siehe Methoden*). Die SEAP-Aktivität im Kulturüberstand wurde 0, 20 und 40h nach Überinfektion mit HSV mit Hilfe des *Great EscAPE SEAP Chemiluminescence Kits* (Fa. Clontech) gemessen (Tab. 4). Bei Konstrukt pBacMam2SEAP mit CMV *ie*

enhancer/chicken β actin promoter-kontrollierter SEAP-Expression ließ sich ein deutlicher SEAP-Aktivitätsanstieg in uninfizierten Zellen nachweisen, wohingegen in infizierten Zellen die SEAP-Expression durch den HSV-host shut off-Effekt reduziert wurde (Abb. 10). Dagegen führte die HSV-Überinfektion zu einem ca. 100-fachen Anstieg der SEAP-Expression unter gD-Promotor-Kontrolle, während in uninfizierten Zellen die SEAP-Expression kaum anstieg (Abb. 11).

Zeit \ Probenname	5 h nach Transfektion, nicht infiziert mit HSV-1	5 h. nach Transfektion, infiziert mit HSV-1 (0 h)	25 h nach Transfektion, nicht infiziert mit HSV-1	25 h. nach Transfektion, infiziert mit HSV-1 (20 h)	45 h nach Transfektion, nicht infiziert mit HSV-1	45 h. nach Transfektion, infiziert mit HSV-1 (40 h)
pBacMam2SEAP	154 602	138 059	24 989 524	14 071 440	42 610 788	17 945 756
pBacMam2-gDproSEAP	151 842	153 382	320 037	36 443 128	1 602 983	40 416 080
Mock	150 353	151 878	142 624	136 859	159 214	165 062

Tab. 4 SEAP-Aktivität in HeLa-Zellen nach Transfektion mit pBacMam2SEAP bzw. pBacMam2gDproSEAP

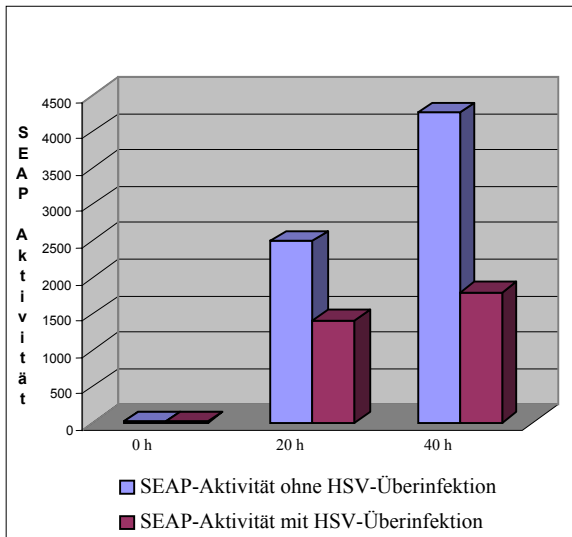


Abb. 10 SEAP-Expression unter CAG-Promotor-Kontrolle in HeLa-Zellen

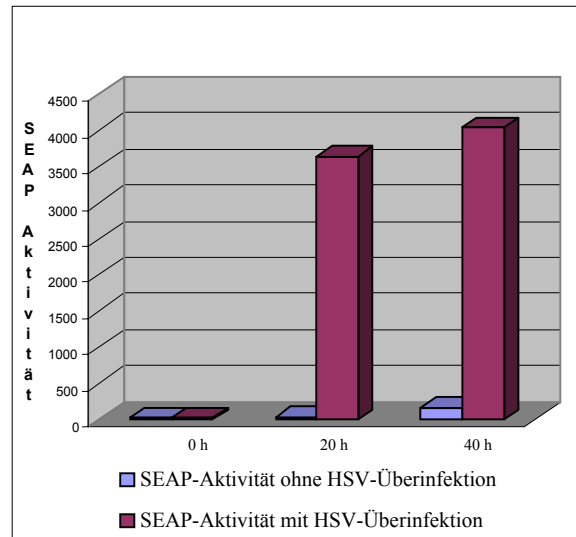


Abb. 11 SEAP-Expression unter HSV-1 gD-Promotor-Kontrolle in HeLa-Zellen

3.4 Herstellung von rekombinanten Baculoviren durch Kotransfektion

Die Sf9-Zellen wurden mit AcNPV-DNA und dem Transferplasmid unter Verwendung von Eufectin Transfection Reagent kotransfiziert (siehe Methoden). Die Zellkulturen wurden anschließend 4-5 Tage bei 27°C inkubiert und die Zellmedium-Überstände zur Virusamplifikation auf frische Sf9-Zellen gegeben. Dabei ließ sich eine deutliche Expression von EGFP bzw. ECFP unter gD- bzw. CAG-Promotorkontrolle auch in infizierten Insektenzellen beobachten (Abb. 12). Der Erfolg der Rekombination und der Virusamplifikation konnte somit durch den Nachweis von grün bzw. blau fluoreszierenden Insektenzellen überprüft werden. Mittels Plaque-Assay wurden die rekombinanten Baculoviren klonal aufgereinigt und zur Herstellung von Virusstammlösungen mit hohem Titer eingesetzt.

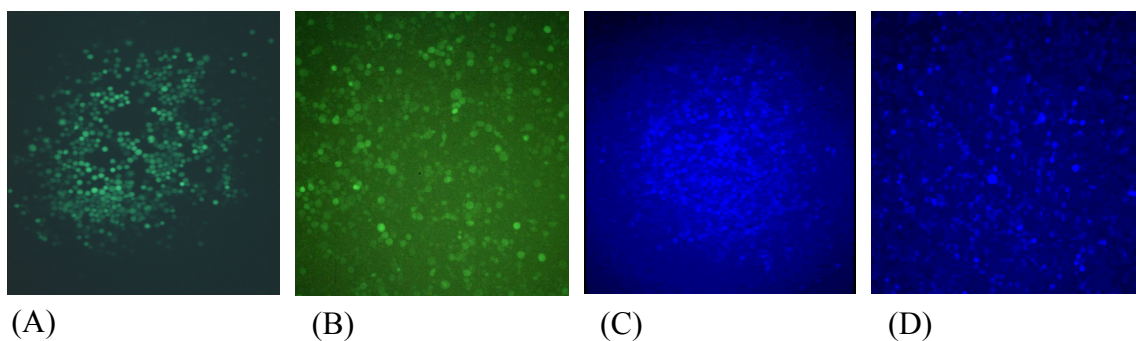


Abb. 12 Sf9 Zellen nach Überinfektion mit rekombinanten Baculoviren mit EGFP bzw. ECFP unter gD-Promotorkontrolle. (A) und (C) Virus-Plaque im Plaque-Assay; (B) und (D) Virusamplifikation

3.5 Transduktionseffizienz von rekombinanten Baculoviren im Vergleich zu anderen Transfektionsmethoden

Die Transduktionseffizienz des Baculovirus-Systems wurde in verschiedenen Zelllinien ausgetestet und mit anderen Transfektionsmethoden (FuGENE6, LipofectAMINE2000) verglichen. In Parallelansätzen wurden Vero- und MRC-5-Zellen nach vom Hersteller empfohlenen Protokollen (*siehe Methoden*) für FuGENE6 und LipofectAMINE2000 mit pBacMam2gDproEGFP transfiziert und 4h nach Transfektion mit HSV-1 überinfiziert. Die Transduktion mit rekombinanten pBacMam2gDproEGFP-tragenden Baculoviren wurde mit einer m.o.i. von ca. 200 p.f.u./Zelle durchgeführt. 4h nach

Transduktion wurden die Zellen mit HSV-1 überinfiziert. Die Transfektions/Transduktionseffizienz wurde 17h nach HSV-1-Überinfektion unter Ausnutzung der EGFP-Autofluoreszenz (Abb. 13) und durch EGFP-Nachweis im Western Blot (Abb. 14) ausgewertet. Dabei wurde im Vergleich zu relativ niedrigen Transfektionsraten bei FuGENE6 und LipofectAMINE2000 eine nahezu 100%ige Transduktionseffizienz durch das Baculovirus-Vektorsystem festgestellt.

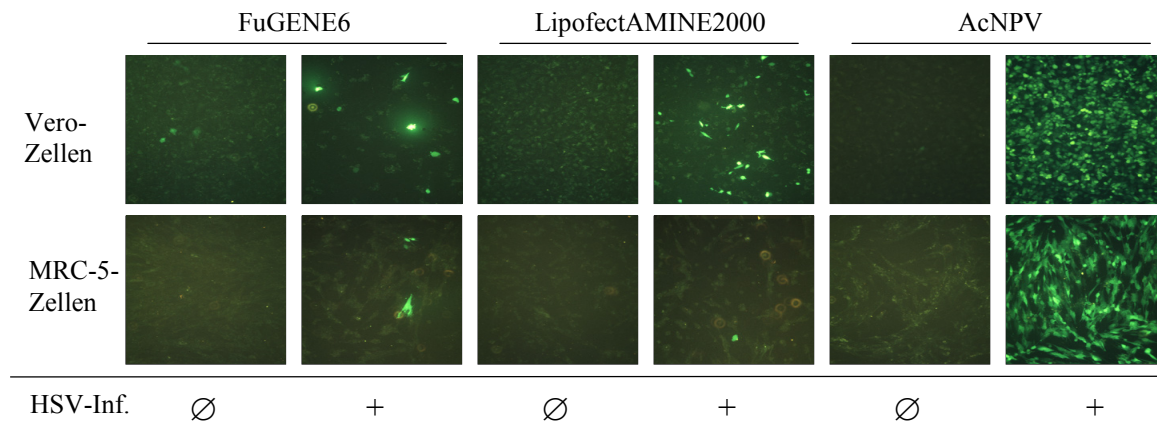


Abb. 13 Vergleich der Effizienz der untersuchten Transfektionsverfahren (FuGENE6, LipofectAMINE2000 und rekombinante Baculoviren) in drei verschiedenen Zelllinien. Gezeigt ist die EGFP-Autofluoreszenz unter HSV-gD-Promotor-kontrolle. Die EGFP-Expression wurde durch HSV-Überinfektion stimuliert.

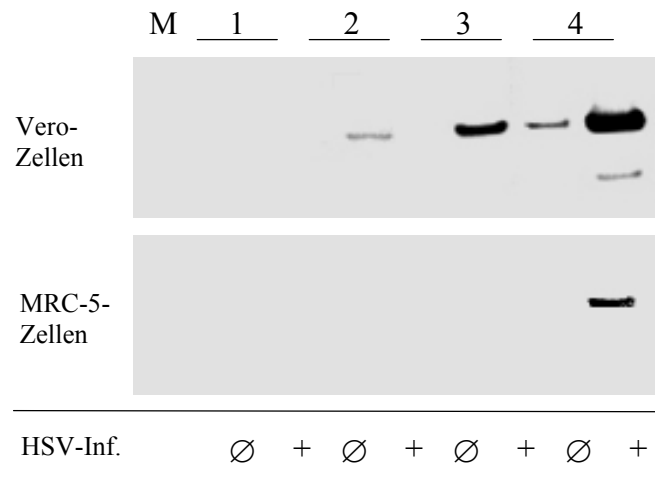


Abb. 14 Nachweis der EGFP-Expression mittels EGFP-spezifischer monoklonaler Antikörper in Vero- und MRC-5-Zellen. 1. Mock-transfizierte Zellen, 2. FuGENE6-Transfektion, 3. LipofectAMINE2000-Transfektion, 4. Transduktion mit rekombinantem AcNPV pBacMam2gDproEGFP. M Molekulargewichtsstandard

3.6 Aufzentrifugation der rekombinanten Baculoviren auf die Zielzellen steigert die Transduktionseffizienz

Für die Transduktion wurden Vero-Zellen in 24-Loch-Platten mit Deckgläschen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 90-100% inkubiert. Um den Aufzentrifugationseffekt besser abschätzen zu können, wurde eine niedrigere m.o.i. von ca. 20 p.f.u./Zelle gewählt. Die dazu notwendige Verdünnung der Virusstammlösung wurde mit MEM (0,85 g/l NaHCO₃) durchgeführt. Die Transduktion der Zellen mit diesen pBacMam2EGFP-tragenden rekombinanten Baculoviren führte zu transienter EGFP-Expression unter CAG-Promotor-Kontrolle. Die verdünnten Virusinokula (200µl) wurden auf die Zellen gegeben und für 45min mit 2500 rpm bei RT zentrifugiert. Anschließend wurden 500µl MEM (2,2 g/l NaHCO₃) in die Vertiefungen mit den Zellen hinzugefügt und die Zellen für weitere 1,5h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Virussuspension abgenommen und durch frisches Zellkulturmedium ersetzt. Die Zellen wurden bis zur Probenentnahme bei 37°C

im Brutschrank inkubiert. 24h nach der Transduktion wurden die Zellen mit Formalin fixiert und auf die Objektträger gebracht. Die Kontrollzellen wurden gleich behandelt, nur der Zentrifugationsschritt wurde durch eine 45-minütige Inkubation bei RT ersetzt. Die EGFP-Autofluoreszenz wurde mit dem Fluoreszenzmikroskop detektiert und fotografisch dokumentiert (Abb. 15). Eine sichtbar höhere EGFP-Autofluoreszenzintensität ließ sich in den durch Aufzentrifugation von Baculoviruspartikeln transduzierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle nachweisen.

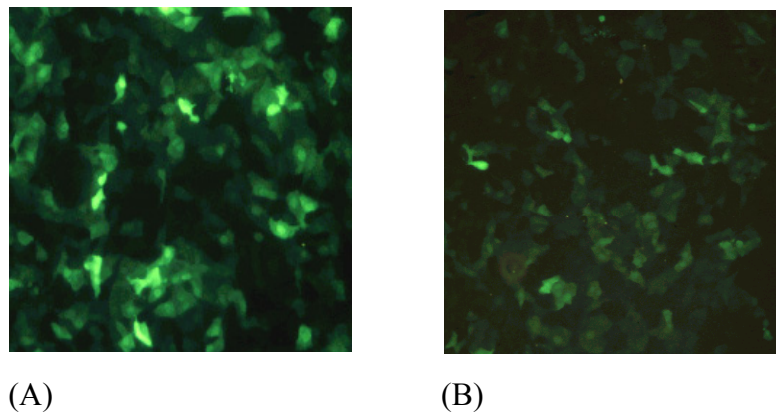


Abb. 15 Vero-Zellen 24h nach Transduktion mit rekombinanten Baculoviren mit EGFP unter CAG-Promotor-Kontrolle. (A) mit Virusaufzentrifugation während der Transduktion; (B) keine Virusaufzentrifugation während der Transduktion

3.7 Zeitlicher Verlauf der SEAP-Expression unter gD-Promotorkontrolle und Aciclovir-Effekt auf die Promotoraktivität

Die Zeitkinetik der SEAP-Expression unter gD-Promotorkontrolle und der Aciclovir-Effekt auf die Promotoraktivität wurden in Vero-Zellen untersucht. Die Zellen wurden in 24-Loch-Platten ausgesät und bei 90%iger Konfluenz mit rekombinanten Baculoviren transduziert (m.o.i. ca. 200 p.f.u./Zelle). Nach der Transduktion wurden die Zellen für 4 Std. bei 37°C in frischem Medium mit Aciclovir (60µg/ml) bzw. ohne Aciclovir inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit HSV-1 überinfiziert (m.o.i. ca. 10 p.f.u./Zelle). Die Proben wurden 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 und 20 h nach der Überinfektion mit HSV-1 entnommen und auf SEAP-Expression untersucht. Die SEAP-Expression wurde durch SEAP-Aktivitäts-Messung mit Hilfe des *Great ESCAPE SEAP*

Chemiluminescence (Clontech) Testkits bestimmt. Zwischen 3h und 5h nach Infektionsbeginn stieg die SEAP-Expressionsrate stark an und erreichte nach 18h ihr Maximum (Tab. 5). Gegenüber dem Nullwert unmittelbar nach Infektion (0h p.i.) kam es zu einem ca. 1850-fachen Anstieg der Enzymaktivität im Zellkulturüberstand. In den mit Aciclovir behandelten Zellen zeigte sich keine deutliche Reduzierung der SEAP-Aktivität. Die SEAP-Expressionsrate in nicht infizierten Zellen blieb auch 25h nach Transduktion mit AcNPV bzw. 20h nach Mock-Infektion mit HSV-1 relativ niedrig (Abb. 16). Die Wirkung von Aciclovir auf die HSV-1-Replikation wurde parallel zum SEAP-Ansatz kontrolliert. Dazu wurden Vero-Zellen der gleichen 24-Loch-Platte mit bzw. ohne vorhergehende Aciclovir-Inkubation (60µg/ml, 4h) unter gleichen Bedingungen wie im SEAP-Ansatz mit HSV-1 überinfiziert. Um nach der Überinfektion die nicht adsorbierten Viren zu inaktivieren, wurden die Zellen mit Citrat-Puffer (pH 3.0) gewaschen und im Kulturmedium mit bzw. ohne Aciclovir weiterinkubiert. Unmittelbar nach dem Waschen mit Citrat-Puffer (0h p.i.) und 24h nach der Überinfektion wurden Proben des Kulturüberstands entnommen. Die Anzahl infektiöser Viruspartikel wurde mit Hilfe des Plaque-Assays bestimmt. In der Vertiefung ohne Aciclovir im Kulturmedium lag die Anzahl von plaquebildenden Viruspartikeln 0h p.i. bei ca. 335 p.f.u./ml und stieg nach 24h auf ca. 141500 p.f.u./ml an. In der Vertiefung mit Aciclovir im Kulturmedium wurden 0h p.i. ca. 275 p.f.u./ml gezählt und 24h p.i. wurden keine plaquebildenden Viruspartikel festgestellt. Der deutliche Anstieg des Virustiters in der Vertiefung mit Zellen ohne Aciclovirzugabe und das Ausbleiben der Virusvermehrung in den Zellen, die mit Aciclovir behandelt wurden, weisen auf eine ausreichende Hemmung der HSV-1-Replikation durch zugegebenes Aciclovir hin.

AcNPV1000 pBacMam2gDpro SEAP	+	+	+	+	∅
HSV-1	+	+	∅	∅	∅
Aciclovir	+	∅	+	∅	∅
0h p.i. (RLU)	6 938	6 200	6 090	5 706	5 330
2h p.i. (RLU)	8 039	8 237	7 564	8 213	5 591
4h p.i. (RLU)	564 353	371 893	9 768	10 524	5 786
6h p.i. (RLU)	2 467 108	2 257 305	9 722	11 019	5 633
8h p.i. (RLU)	5 446 616	5 518 995	11 370	12 187	5 583
10h p.i. (RLU)	8 520 112	8 156 241	11 174	10 955	7 021
12h p.i. (RLU)	10 788 437	9 390 722	11 574	12 811	6 289
14h p.i. (RLU)	11 991 226	10 110 858	12 535	13 621	6 384
16h p.i. (RLU)	13 074 894	10 115 488	15 257	16 410	6 101
18h p.i. (RLU)	13 722 506	9 898 322	17 194	20 164	5 731
20h p.i. (RLU)	12 838 340	9 900 025	19 829	23 194	4 613

Tab. 5 Zeitlicher Verlauf der SEAP-Expression unter gD-Promotor-Kontrolle in mit AcNPVpBacMam2gDproT7SEAP transduzierten Vero-Zellen. RLU - relative *light units*, h.p.i. – *hours post infection*

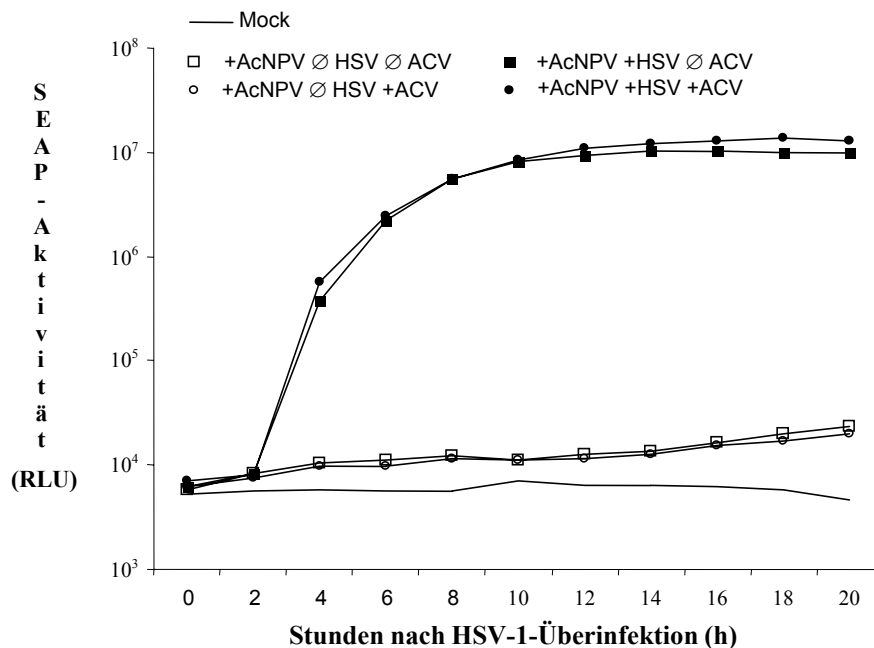


Abb. 16 Zeitlicher Verlauf der SEAP-Expression unter gD-Promotor-Kontrolle in mit AcNPV1000 pBacMam2gDproSEAP transduzierten Vero-Zellen. Graphische Darstellung von Messdaten aus der Tabelle 5. Die Y-Achse ist logarithmisch skaliert. RLU – relative *light units*, ACV - Aciclovir

3.8 Bestimmung der Persistenzdauer von Baculovirus-DNA in transduzierten Zellen

Um den Zeitraum, in dem nach Transduktion noch eine Genexpression möglich ist, zu ermitteln, wurden MRC-5-Zellen in 24-Loch-Platten ausgesät und bei 70%iger Konfluenz mit rekombinanten Baculoviren (AcNPV3000 + pBacMam2gDproEGFP) transduziert (m.o.i. 200 p.f.u./Zelle). Nach der Transduktion wurden die Zellen für 4 h bei 37°C in frischem Medium inkubiert. Die transduzierten MRC-5-Zellen wurden dann 4, 24, 48, 72 und 96 h nach der Transduktion mit HSV-1 überinfiziert (m.o.i. 10 p.f.u./Zelle). Die Deckgläser mit dem Zellrasen wurden jeweils 18 h nach Überinfektion mit HSV-1 entnommen und auf EGFP-Expression unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die höchste EGFP-Expressionsrate wurde in den 4 h nach der Transduktion überinfizierten Zellen festgestellt und nahm mit jeweils späteren Überinfektionszeitpunkt kontinuierlich ab (Abb. 17). Dennoch wurde auch in 96 h nach der Transduktion überinfizierten Zellen eine visuell gut feststellbare EGFP-Expression dokumentiert.

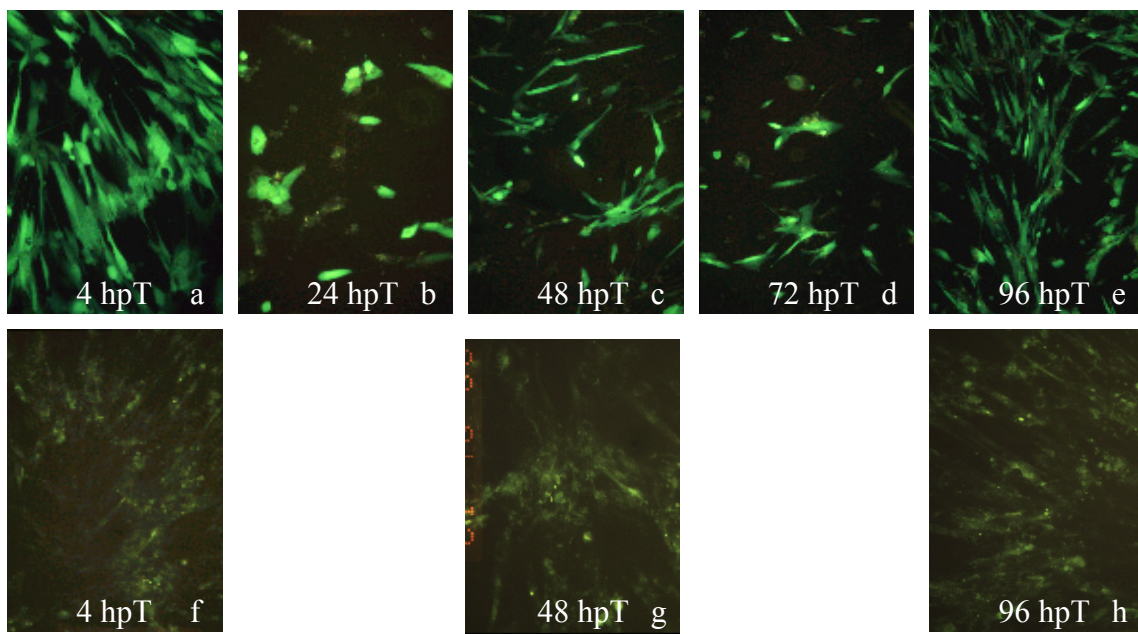


Abb. 17 EGFP-Expression unter HSV-1 gD-Promotor-Kontrolle in den mit rekombinanten Baculoviren (AcNPV3000 + pBacMam2gDproEGFP) transduzierten und nach jeweils zunehmenden Zeitabständen post Transduktion (pT) mit HSV-1 überinfizierten MRC-5-Zellen. Überinfektion mit HSV-1 4, 24, 48, 72 und 96 h post Transduktion (a-e). Mock-infizierte MRC-5-Zellen 4, 48 und 96 h post Transduktion (f-h).

3.9 Testung der Aktivierbarkeit des HSV-1 gD-Promotors durch weitere Herpes-Viren

Für die Untersuchung der Fähigkeit von HSV-2 bzw. VZV und CMV, den HSV-1 gD-Promotor zu aktivieren, wurden Vero- bzw. MRC-5-Zellen in 24-Loch-Platten ausgesät und bei 90%iger Konfluenz mit rekombinanten Baculoviren (AcNPV3000 + pBacMam2gDproEGFP) transduziert (m.o.i. ca. 200 p.f.u./Zelle). Nach der Transduktion wurden die Zellen für 4 h bei 37°C in frischem Medium inkubiert. Anschließend wurden die Vero-Zellen mit HSV-2 (freundlicherweise überlassen von L. Lippelt, m.o.i. 5 p.f.u./Zelle) und die MRC-5-Zellen mit VZV (Varilrix®, Varizellen-Lebendimpfstoff, SmithKline Beecham Pharma GmbH, m.o.i. 0,05 p.f.u./Zelle) bzw. CMV (Patientenisolat des Instituts f. Mikrobiologie, Münster) überinfiziert. Die Deckgläser mit dem Zellrasen wurden 18h nach der Überinfektion mit HSV-2 bzw. VZV und CMV entnommen und auf EGFP-Expression unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht und photographisch dokumentiert (Abb. 18). Die in den Vero-Zellen festgestellte EGFP-Expressionsaktivität nach HSV-2-Überinfektion war ähnlich hoch wie nach HSV-1-Überinfektion in den vorausgegangenen Versuchen, wohingegen in MRC-5-Zellen kaum EGFP-Expression nach VZV- bzw. CMV-Überinfektion festgestellt wurde.

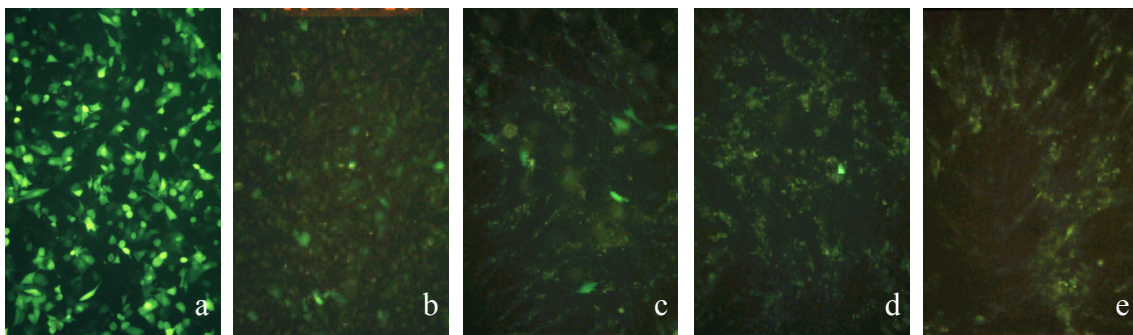


Abb. 18 HSV-1 gD-Promotor-Aktivierung durch HSV-2- bzw. VZV- und CMV-Überinfektion der mit rekombinanten Baculoviren transduzierten Vero- bzw. MRC-5-Zellen. EGFP-Expression unter gD-Promotor-Kontrolle in Vero-Zellen nach HSV-2-Überinfektion (a) und ohne HSV-2-Überinfektion (b). EGFP-Expression unter gD-Promotor-Kontrolle in MRC-5-Zellen nach VZV- (c) bzw. CMV-Überinfektion (d) und ohne Überinfektion (e).

3.10 Transiente Expression viraler autofluoreszierender Fusionskonstrukte mittels Baculovirus-vermittelter Transduktion

Die Fusionskonstrukte pBacMam2gDproUL35EGFP und pBacMam2gDproUL35ECFP wurden für die Herstellung von rekombinanten Baculoviren eingesetzt. Die rekombinanten Baculoviren wurden mehrfach plaqueaufgereinigt und mittels Ultrazentrifugation zu hochtitrigen Virusstocks ankonzentriert. Die Expression und die intrazelluläre Verteilung der Fusionsproteine VP26(UL35)EGFP und VP26(UL35)ECFP wurde in Vero-Zellen nach Transduktion mit rekombinanten Baculoviren untersucht. Die Zellen wurden in 24-Loch-Platten ausgesät und bei 90%iger Konfluenz mit rekombinanten Baculoviren transduziert (m.o.i. ca. 200 p.f.u./Zelle). Nach der Transduktion wurden die Zellen für 4 Std. bei 37°C in frischem Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit HSV-1 überinfiziert (m.o.i. ca. 10 p.f.u./Zelle). Die Deckgläser mit dem Zellrasen wurden 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 und 16h nach der Überinfektion mit HSV-1 entnommen und auf VP26EGFP-Expression und dessen zelluläre Lokalisation unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht und fotografisch dokumentiert (Abb. 19). Der zeitliche Verlauf der Expression und die intrazellulären Verteilungsmuster von VP26EGFP bzw. VP26ECFP waren identisch. Weiterhin entsprach das intrazelluläre Verteilungsmuster der beiden Fusionsproteine den von Desai & Person, 1998 publizierten Ergebnissen (109). So sieht man 2-4 h nach der Überinfektion mit HSV-1 eine zunehmende EGFP-Fluoreszenz, die zunächst über die ganze Zelle verteilt ist. 8-12 h p.i. sieht man in den meisten Zellen eine Konzentrierung der EGFP-Fluoreszenz in intranukleär liegenden, leuchtenden Punkten. Die intranukleäre Lokalisation von EGFP wird durch den VP26-Fusionsanteil bedingt und entspricht der Lokalisation von Capsidkomponenten während eines lytischen Infektionszyklus von HSV. Zu einem späteren Zeitpunkt lässt sich VP26EGFP bzw. VP26ECFP wieder vermehrt zytoplasmatisch bzw. an den Zellgrenzen nachweisen, was der Ausschleusung von Nachkommenviren entspricht.

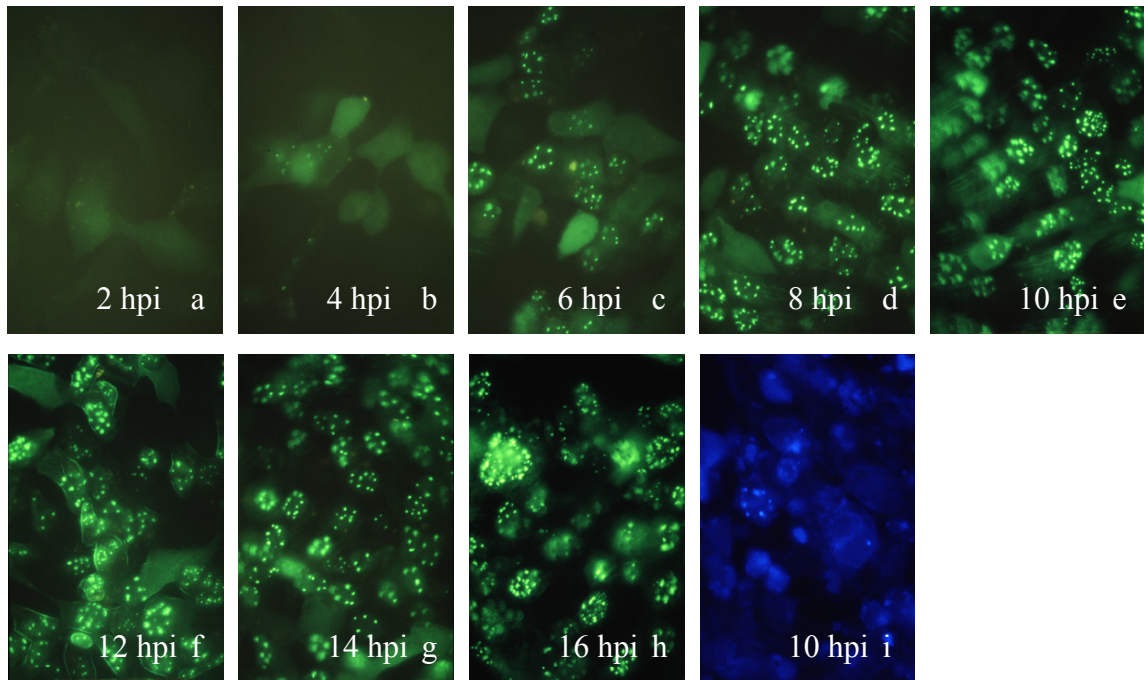


Abb. 19 Expression von VP26EGFP- bzw. VP26ECFP-Fusionsproteinen in mit Baculoviren transduzierten und mit HSV-1 überinfizierten Vero-Zellen. Zeitkinetik der VP26EGFP-Expression (a-h), VP26ECFP-Expression 10 hpi (i)

4. Diskussion

Die Interaktion viraler und zellulärer Proteine, der intrazelluläre Transport von HSV und die diese Vorgänge kontrollierenden Mechanismen stehen nach wie vor im Mittelpunkt des Interesses und sind noch nicht abschließend geklärt. Bei vielen Fragestellungen ist eine effiziente Genexpression in HSV-infizierten Zellen notwendig. Idealerweise sollte das transient exprimierte Gen sich wie ein HSV-Gen verhalten, um den zeitlichen und räumlichen Verhältnissen der Proteinexpression und des Proteintransports in infizierten Zellen möglichst nahe zu kommen.

Übergeordnetes Ziel des Forschungsprojektes, in dessen Rahmen diese Arbeit durchgeführt wurde, ist es, das räumliche und zeitliche Transport- und Ausbreitungsmusters von HSV in intakten Zielzellen mittels autofluoreszierender viraler Hüll-, Tegument- und Kapsidproteine sowie gleichzeitiger autofluoreszierender Markierung subzellulärer Organellen und Strukturen wie Golgi-Apparat, Endoplasmatisches Retikulum und Zytoskelett näher zu analysieren. Da im Rahmen dieses Projekts auch die Transfektion primärer Zellen erforderlich wird und die bisherigen Erfahrungen mit Standardtransfermethoden wie Elektroporation, Calciumphosphatmethode und Lipofektion nicht zufriedenstellend waren, bestand die konkrete Aufgabestellung dieser Arbeit in der Untersuchung eines Baculovirus-transduktionssystems als alternative Gentransfermethode auf seine Eignung zur transienten Genexpression in HSV-1-infizierten Zellen.

Zunächst wurden die Eigenschaften eines kommerziell angebotenen Baculovirus-transduktionssystems (BacVector™ Transfection Kits, Novagen, bestehend aus Expressionsvektor pBacMam2, linearisierter und modifizierter Baculovirus-DNA, Eufectin™ Transfection Reagent und Insektenzellen Sf9) mit anderen Transfektionsmethoden (Elektroporation, Lipofektion) verglichen. In diesen Vorversuchen wurde der unveränderte Transfervektor pBacMam2 mit den Reporterproteinen EGFP bzw. SEAP versehen und zur Herstellung von rekombinanten Baculoviren eingesetzt. Die Reporterprotein-Expression von diesen Vektoren erfolgte unter Kontrolle des CAG-Promotors, eines starken und konstitutiv in einem breiten Zellspektrum aktiven Promotors (111, 84). Diese Eigenschaften des CAG-Promotors lieferten zwar eine gute Verifizierungsmöglichkeit der erfolgreich transduzierten Zellen, erlaubten aber aufgrund der langen biologischen Halbwertszeit von EGFP keine Kontrolle der

Expressionskinetik nach erfolgreicher Transduktion und Beginn der Expression. Weiterhin stellte es sich heraus, dass die Expressionsaktivität von pBacMam2SEAP durch anschließende HSV-1-Überinfektion deutlich reduziert wird (Abb. 10). Da das primäre Transkript von pBacMam2 in Säugerzellen ein Intron enthält, ist nach der Transkription von inklonierten Genen zunächst ein Spleißvorgang erforderlich, bevor reife mRNA gebildet wird. Diese Konstellation wird im Originalvektor pBacMam2 zur Steigerung der Expressionsaktivität benutzt (22, 96). Durch mehrere Arbeiten wurde die Inhibition des Spleißvorgangs neusynthetisierter zellulärer RNA-Moleküle als ein Angriffspunkt des in HSV-infizierten Zellen beobachteten Shut-off-Phänomens identifiziert (49, 48). Eine weitere Ursache der abnehmenden Expressionsaktivität des CAG-Promotors in HSV-infizierten Zellen könnte der durch das vhs-Protein bedingte Abbau und die Destabilisierung der zellulären mRNA-Spezies sein. Die hierdurch bedingte Reduktion der Proteinsynthese könnte auch die zellulären Transkriptionsfaktoren betreffen, die an der CAG-Promotor-Aktivierung mitbeteiligt sind. In parallel laufenden Versuchen unserer Arbeitsgruppe zeigte sich auch ein ausgeprägter *host shut off*-Effekt von HSV-1 auf die Reporterproteinexpression von ungespleißten Transkripten, die direkt unter CMV-IE-Promotor- und unter SV40-Early-Promotor-Kontrolle exprimiert wurden. Mittlerweile wurde in mehreren Publikationen aus der Arbeitsgruppe von B. Roizman der Einsatz rekombinanter Baculoviren zum Gentransfer in anschließend mit HSV-1-Wildtyp bzw. mit diversen HSV-Mutanten infizierten Säugetierzellen beschrieben (109, 88, 47, 73, 141). Dabei wurde die Expression der transfizierter Gene immer durch Platzierung des CMV-IE-Promotors direkt vor die Gensequenz gesteuert. Hinweise auf eine Reduktion der Proteinexpression durch den *host shut-off*-Effekt nach der HSV-Infektion wurden in keinem der Artikel gegeben. Allerdings gehörte die mögliche Beeinflussung der CMV-IE-Promotor-Aktivität durch HSV-Infektion auch nicht zur unmittelbaren Fragestellung in diesen Artikeln.

Diese Tatsachen führten zur Überlegung, bei dem Austausch des CAG-Promotors im pBacMam2 durch den gD-Promotor die Exon1- und Intronregion ebenfalls zu entfernen, um potentielle Angriffsstellen des HSV-Shut-off-Phänomens zu reduzieren. So wurde das gD-Promotor-DNA-Fragment unmittelbar vor die codierende Region des Reportergens (SEAP bzw. EGFP) inseriert. Im folgenden Schritt sollten der gD- und CAG-Promotor hinsichtlich Expressionsaktivität und Expressionsverhalten in HSV-

infizierten Zellen untersucht und vergleichend analysiert werden. In dem dazu durchgeführten Test wies der gD-Promotor eine (unerwartet) niedrige Aktivität in uninfizierten Zellen auf. Nach Aktivierung durch HSV-Infektion zeigte er jedoch eine ähnliche Expressionsstärke wie der CAG-Promotor in uninfizierten Zellen (Abb. 10, 11). Überraschend im Vergleich hierzu war die starke Aktivität des gD-Promotors in Baculovirus-infizierten Insektenzellen und bei der Kotransfektion von pBacMam2-Derivaten mit Baculovirus-DNA. Diese Aktivität blieb bei der alleinigen Transfektion der Insektenzellen mit gD-Promotor tragenden pBacMam2-Derivaten aus und zeigte sich erst, wenn diesen Ansätzen Baculovirus-DNA hinzugefügt wurde (Daten nicht gezeigt). Bei der Transduktion von Säugetierzellen mit rekombinanten Baculoviren blieb die Aktivität des gD-Promotors in uninfizierten Zellen wie bei der Transfektion von Plasmid-DNA zunächst niedrig, konnte aber durch HSV-1-Überinfektion signifikant gesteigert werden. In weiteren Versuchen durch unsere Arbeitsgruppe konnte die gute Aktivierbarkeit des gD-Promotors auch in anderen Vektorsystemen bestätigt werden. Allerdings zeigte sich bei Verwendung von nichtbaculoviralen Transfektionssystem eine ausgeprägte, unspezifische Aktivität des gD-Promotors auch in uninfizierten Zellen, die möglicherweise auch von Vektorgröße und den Promotorbereich umgebende Strukturen des Vektors beeinflusst wird. (Hafezi Diss. 2002). Die Ursachen für das unterschiedliche Verhalten des gD-Promotors in Säugetier- und Insektenzellen wurden in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Dieses Phänomen könnte jedoch durch unterschiedliche Ausstattung der beiden Zellarten mit aktivierenden bzw. inhibierenden Transkriptionsfaktoren mitbedingt sein.

Die virusspezifische, starke Aktivität des in pBacMam2-Derivate und später in rekombinanten Baculoviren integrierten gD-Promotors bei der Transduktion der Säugetierzellen machte diesen Promotor zu einem nützlichen und vielversprechenden Bestandteil der in dieser Arbeit hergestellten Expressionsvektoren. Um die Nutzbarkeit der pBacMam2-Derivate zu erweitern, wurden Konstrukte hergestellt, in denen zusätzlich zum gD-Promotor ein T7-Promotor einkloniert wurde. Dies sollte es später ermöglichen, die entsprechenden Vektoren zusätzlich für die *in vitro*-Synthese von RNA-Gensonden, beispielsweise für Northern Blots und Southern Blots, oder für *in situ*-Hybridisierungen einsetzen zu können. Die Funktion des T7-Promotors konnte über die erfolgreiche Generierung von *In Vitro*-RNA-Transkripten nachgewiesen werden

(Abb. 9). Auch die mögliche Beeinflussung der gD-Promotor-Funktion durch die T7-Promotor-Sequenz wurde durch Vergleich von SEAP-Expressionsstärke und -verlauf über die Konstrukte pBacMam2gDproSEAP und pBacMam2gDproT7SEAP in HSV-1-infizierten Zellen untersucht. Dabei wurden keine Unterschiede in SEAP-Expressionstärke und -verlauf festgestellt. Mittlerweile wird ein funktionell ähnlicher Baculovirusvektor, der allerdings mit drei Promotoren (CAG, T7 und p10) ausgestattet ist und Proteinexpression in Säugetierzellen, E. coli und Insektenzellen ermöglicht, als zeit- und ressourcensparendes Instrument für Expressionsanalysen auf dem kommerziellen Markt angeboten (92).

4.1 Eigenschaften des Baculovirustransfersystems

Die in dieser Arbeit verwendeten Reporterproteine SEAP (*secreted alkaline phosphatase*) und EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) erwiesen sich als hilfreiche und bequeme Werkzeuge bei der Untersuchung der Promotoreigenschaften bzw. beim Vergleich der Gentransfermethoden (7, 137, 19). Die Messung der SEAP-Aktivität im Überstand von Zellkulturen, die mit SEAP-tragenden Konstrukten (pBacMam2SEAP, pBacMam2gDproSEAP) transfiziert wurden, erlaubte eine fortlaufende Beobachtung der Promotorenfunktion und -aktivität vor und nach der Überinfektion mit HSV-1. Der Nachweis der EGFP-Expression in transfizierten Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie ermöglichte die visuelle Identifizierung und Quantifizierung des Prozentsatzes der Zellen, in die erfolgreich Fremd-DNA eingeschleust wurde. Dies ermöglichte es, Effizienz und Qualität des Baculovirusystems mit gängigen Transfektionsverfahren zu vergleichen.

Die unerwartet starke Aktivität des gD-Promotors in Insektenzellen erlaubte schon sehr früh die funktionelle Kontrolle der Konstrukte und erleichterte erheblich die Selektion rekombinanter Insektenviren über Plaque-Aufreinigung. Nach der Amplifikation der klonal aufgereinigten Viren bestand die Möglichkeit, Virusstocks mit hohem Titer ($> 1 \times 10^8$) mittels Ultrazentrifugation herzustellen. Die hochtitrigen Virusstocks ermöglichten dann die Durchführung von Transduktionen mit einer m.o.i. von mehr als 200 p.f.u./Zelle, wodurch sich die Protein-Expressionsrate erhöhen ließ. Die Transduktionseffizienz ließ sich auch wie von Kotani et al. 1994 beschrieben durch Aufzentrifugation der Virus-Inokula auf die Zielzellen nochmals deutlich steigern (Abb. 15) (61). Somit

konnten auch bei Transduktionen mit niedrigtitrigen Virusstocks die Expressionsraten erhöht werden. Weiterhin erlaubte die Herstellung von großvolumigen Virusstocks, deren Qualität sich über längere Zeit nicht änderte, die Ausgangsbedingungen für wiederholt durchgeführte Transduktionsversuche konstant zu halten. Im Vergleich dazu fiel die Transfektionseffizienz der anderen gängigen Gentransfermethoden (z.B. mit den kommerziellen Produkten FuGENE6 und LipofectAMINE2000) bei Versuchswiederholungen unter gleichen Ausgangsbedingungen häufig unterschiedlich aus, was durch das ständige Neuansetzen der Transferreagenzien bei Ansatzwiederholungen mitbedingt sein könnte. Ein weiterer Faktor, der die Transfektionseffizienz dieser beiden Methoden deutlich beeinflusste, war die Wahl der zu transfizierenden Zelllinie. So erreichte man bei der Transfektion von HeLa-Zellen unter Verwendung von FuGENE6 bzw. LipofectAMINE2000 die besten Transfektionsraten, wobei maximal 10-20% der Zellen erfolgreich transfiziert wurden. Bei der Transfektion von Vero-Zellen lag die Transfektionseffizienz beider Methoden nur bei 5-15% der Zellen und bei MRC-5-Zellen (humane diploide Fibroblasten) unter 5%. Auch die Steigerung der DNA-Menge im Transfektionsansatz, die zwangsläufig eine Erhöhung der Transferreagenzien erforderlich machte, führte nicht zu besseren Transfektionsraten, eher nahmen die ohnehin schon vorhandenen morphologischen Veränderungen an den transfizierten Zellen deutlich zu. Der Baculovirus-vermittelte Transfer der gleichen Konstrukte erreichte dagegen konstant Transduktionsraten von praktisch 100% in allen drei Zelllinien, ohne signifikante morphologische Zellveränderungen herbeizuführen. Dementsprechend war auch die im Western Blot nachgewiesene EGFP-Expressionsrate in mit rekombinanten Baculoviren transduzierten Zellen deutlich größer als in Zellen, die mit FuGENE6 bzw. LipofectAMINE2000 transfiziert wurden (Abb. 13, 14).

Nachdem das Baculovirustransfersystem durch seine hohe Transduktionsraten ohne feststellbare Beeinträchtigung der Zellmorphologie und einfache Handhabung überzeugen konnte, wurde besonderes Augenmerk bei den weiteren Untersuchungen auf die Funktion der HSV-Gene bzw. deren Produkte gelegt, die baculovirusvermittelt in die Zielzellen eingebracht wurden. So wurde der zeitliche Verlauf der gD-Promotor-Aktivierung nach HSV-1-Überinfektion untersucht. Parallel dazu wurde auch der Einfluss einer HSV-Replikationshemmung durch Aciclovir auf die gD-Promotor-Aktivität analysiert. Das HSV-1-Glycoprotein D (gD, US6) gehört zur Gruppe der

sogenannten γ_1 -Gene (3, 113). Die Expression von γ_1 -Genen in HSV-1-infizierten Zellen ist auf die Anwesenheit von intakten α -Proteinen (zumindest ICP4) angewiesen und erfolgt im Gegensatz zu γ_2 -Genen auch in Abwesenheit einer Virus-DNA-Replikation (128, 77). Zur vollständigen Aktivierung ist jedoch eine DNA-Replikation und der damit verbundene sogenannte Gendosisseffekt erforderlich (128). Die Transkription des gD-Gens und die nachfolgende Translation erfolgt schon relativ früh im Infektionszyklus. So lässt sich bereits 2 Stunden nach der Infektion der *Precursor* von gD in infizierten Zellen detektieren (24). Auch unsere Ergebnisse deuteten auf einen frühen Zeitpunkt der gD-Promotor-Aktivierung nach HSV-1-Überinfektion hin. So lag die maximale Zunahme der SEAP-Aktivität zwischen 2 und 5 Stunden nach Überinfektion der transduzierten Zellen, was auf die starke gD-Promotor-Aktivierung in diesem Zeitraum hindeutete. In den mit Aciclovir behandelten Zellen erfolgte eine gleich starke gD-Promotor-Aktivierung nach HSV-1-Überinfektion, die auch in ihrem zeitlichen Ablauf identisch mit der gD-Promotor-Aktivierung in unbehandelten Zellen war. Die ausreichende Hemmung der HSV-1-Replikation durch die gewählte Aciclovir-Konzentration wurde in einem Parallelansatz mit Hilfe des Plaque-Assays kontrolliert. Somit hemmt Aciclovir zwar die Replikation der Virus-DNA und Entstehung von Nachkommenviren, hat aber keinen Einfluss auf die frühe gD-Promotor-Aktivität in HSV-infizierten Zellen (33). Als Nebenbefund wurden bei Aciclovir-behandelten Zellen nur minimale morphologische Veränderungen wie Zelllyse oder Abrundung der Zellen nach HSV-1-Überinfektion festgestellt. Die Eigenschaft des gD-Promotors, trotz Aciclovir-Wirkung die volle Aktivität zu erreichen, könnte sich auch bei Fragestellungen, in denen man die unerwünschten morphologischen Veränderungen nach HSV-1-Infektion vermeiden möchte, als hilfreich erweisen.

4.2 Transiente Expression von VP26EGFP und VP26ECFP mittels Baculovirus-vermittelter Transduktion in Vero-Zellen

Mögliche Auswirkungen des Baculovirus-transfersystems auf Stabilität, Transport und Funktion der autofluoreszierenden viralen Fusionsproteine wurden mit rekombinanten Baculoviren untersucht, die in der Literatur bereits beschriebene Fusionskonstrukte exprimierten. Neuere Publikationen zeigten, dass sich funktionsfähige EGFP-Fusionskonstrukte mit dem viralen Kapsidprotein VP26 (UL35) erzeugen lassen und

replikationsfähige, das EGFP-UL35-Fusionskonstrukt an Stelle des wt-Proteins exprimierende HSV-Mutanten herstellen lassen (30, 21). Somit eignete sich VP26 optimal für unsere Fragestellung.

VP26 ist eines der sieben Kapsidproteine von HSV-1. Es wird durch das γ_2 -Gen UL35 kodiert und ist mit einem Molekulargewicht von 12 kDa das kleinste Kapsidprotein (28, 80). Während des Infektionszyklus wird reifes UL35 in den Kern von infizierten Zellen transportiert und dort in die Kapside eingebaut (81, 126). Dieser Einbauvorgang ist abhängig von der Anwesenheit eines weiteren Kapsidproteins, VP5 (99, 134). Reife, DNA-haltige Kapside knospen durch die innere Zellkernmembran in den Perinuklearraum und erhalten dabei eine primäre Lipidhülle. Wie der weitere Transport vom Perinuklearraum zur Zelloberfläche und die Freisetzung von Nachkommenviren aus der Zelle erfolgt, wird kontrovers diskutiert. Dieser Prozess der Virusausschleusung von der Bildung der Kapside im Kern bis zum Austritt aus der Zelle konnte von Desai et al. 1998 mittels einer VP26-GFP tragenden HSV-Mutante erstmals direkt visuell verfolgt und photographisch dokumentiert werden. Die von uns erzeugten UL35EGFP- bzw. UL35ECFP-Fusionskonstrukte wurden hinsichtlich ihres intrazellulären Verteilungsmuster und des zeitlichen Ablaufs der Lokalisationsänderung von VP26EGFP bzw. VP26ECFP in transduzierten und mit HSV-1-überinfizierten Vero-Zellen vergleichend analysiert. Unsere Ergebnisse stimmten mit den von Desai et al. 1998 publizierten Daten weitgehend überein, sowohl in Hinsicht auf räumliche Verteilung als auch im zeitlichen Ablauf der Lokalisationsänderung der beiden VP26-Fusionsproteine in infizierten Vero-Zellen (30). Somit konnte eine eventuelle Beeinflussung der Eigenschaften von autofluoreszierenden viralen Fusionsproteine durch Einbau in einen Baculovirus-Transfervektor bzw. durch Baculoviren oder deren Bestandteile in den infizierten Zellen selbst nicht nachgewiesen werden.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Eignung des Baculovirus-Transduktionssystems zur transienten Proteinexpression in HSV-1-infizierten Zellen untersucht. Es wurde gezeigt, dass das Baculo-Transfersystem in seiner Transduktionseffizienz anderen kommerziellen Produkten zum Gentransfer (FuGENE6 und LipofectAMINE2000) deutlich überlegen ist. Durch Modifikation des Originalvektors pBacMam2 (Austausch des CAG-Promotors durch den HSV-1-eigenen gD-Promotor, Entfernung der Intron-Exon-Region) blieb die durch das Shut-off-Phänomen in HSV-1-überinfizierten Zellen bedingte Reduktion der Genexpression des Originalvektors aus. Weiterhin erwies sich der gD-Promotor als starker, spezifisch durch die HSV-1-Überinfektion aktivierbarer Promotor. Durch Herstellung von rekombinanten Baculoviren, die autofluoreszierende HSV-1-Fusionskonstrukte exprimierten, und vergleichende Analyse von Transport, Funktion, zeitlicher Verteilungskinetik dieser Fusionskonstrukte in Baculovirus-transduzierten Zellen mit Literaturdaten zur transienten Genexpression in HSV-1-infizierten Zellen wurde am Beispiel des viralen Kapsidproteins VP26 gezeigt, dass die Verwendung des Baculovirus-Transfersystems keine signifikante Beeinflussung der zellbiologischen Eigenschaften rekombinanter Virusproteine verursacht.

6. Literaturverzeichnis

1. Ablashi,D.V.; Balachandran,N.; Josephs,S.F.; Hung,C.L.; Krueger,G.R.; Kramarsky,B.; Salahuddin,S.Z.; Gallo,R.C. (1991). Genomic polymorphism, growth properties, and immunologic variations in human herpesvirus-6 isolates. *Virology* 184(2):545-552.
2. Andreason,G.L.; Evans,G.A. (1988). Introduction and expression of DNA molecules in eukaryotic cells by electroporation. *Biotechniques* 6(7):650-660.
3. Arsenakis,M.; Campadelli-Fiume,G.; Roizman,B. (1988). Regulation of glycoprotein D synthesis: does alpha 4, the major regulatory protein of herpes simplex virus 1, regulate late genes both positively and negatively? *J.Virol.* 62(1):148-158.
4. Ayres,M.D.; Howard,S.C.; Kuzio,J.; Lopez-Ferber,M.; Possee,R.D. (1994). The complete DNA sequence of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 202(2):586-605.
5. Barsoum,J.; Brown,R.; McKee,M.; Boyce,F.M. (1997). Efficient transduction of mammalian cells by a recombinant baculovirus having the vesicular stomatitis virus G glycoprotein. *Hum.Gene Ther.* 8(17):2011-2018.
6. Becker,Y.; Asher,Y.; Weinberg-Zahlering,E.; Rabkin,S.; Friedmann,A.; Kessler,E. (1978). Defective herpes simplex virus DNA: circular and circular-linear molecules resembling rolling circles. *J.Gen.Virol.* 40(2):319-335.
7. Berger,J.; Hauber,J.; Hauber,R.; Geiger,R.; Cullen,B.R. (1988). Secreted placental alkaline phosphatase: a powerful new quantitative indicator of gene expression in eukaryotic cells. *Gene* 66(1):1-10.
8. Berglund,P.; Tubulekas,I.; Liljestrom,P. (1996). Alphaviruses as vectors for gene delivery. *Trends Biotechnol.* 14(4):130-134.
9. Birnboim,H.C.; Doly,J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic.Acids.Res.* 7(6):1513-1523.
10. Boehmer,P.E.; Lehman,I.R. (1997). Herpes simplex virus DNA replication. *Annu. Rev.Biochem.* 66:347-384.
11. Boyce,F.M.; Bucher,N.L. (1996). Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 93(6):2348-2352.
12. Browne,H.; Bell,S.; Minson,T.; Wilson,D.W. (1996). An endoplasmic reticulum-retained herpes simplex virus glycoprotein H is absent from secreted virions: evidence for reenvelopment during egress. *J.Virol.* 70(7):4311-4316.

13. Brunetti,C.R.; Burke,R.L.; Kornfeld,S.; Gregory,W.; Masiarz,F.R.; Dingwell,K.S.; Johnson,D.C. (1994). Herpes simplex virus glycoprotein D acquires mannose 6-phosphate residues and binds to mannose 6-phosphate receptors. *J.Biol.Chem.* 269(25):17067-17074.
14. Bryant,H.E.; Wadd,S.E.; Lamond,A.I.; Silverstein,S.J.; Clements,J.B. (2001). Herpes simplex virus IE63 (ICP27) protein interacts with spliceosome-associated protein 145 and inhibits splicing prior to the first catalytic step. *J.Virol.* 75(9):4376-4385.
15. Buchschacher,G.L.,Jr. (2001). Introduction to retroviruses and retroviral vectors. *Somat.Cell Mol.Genet.* 26(1-6):1-11.
16. Bueler,H. (1999). Adeno-associated viral vectors for gene transfer and gene therapy. *Biol.Chem.* 380(6):613-622.
17. Campadelli-Fiume,G.; Cocchi,F.; Menotti,L.; Lopez,M. (2000). The novel receptors that mediate the entry of herpes simplex viruses and animal alphaherpesviruses into cells. *Rev.Med.Virol.* 10(5):305-319.
18. Capecchi,M.R. (1980). High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell* 22:479-488.
19. Chalfie,M.; Tu,Y.; Euskirchen,G.; Ward,W.W.; Prasher,D.C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263(5148):802-805.
20. Chang,Y.; Cesarman,E.; Pessin,M.S.; Lee,F.; Culpepper,J.; Knowles,D.M.; Moore,P.S. (1994). Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 266(5192):1865-1869.
21. Chi,J.H.; Wilson,D.W. (2000). ATP-Dependent localization of the herpes simplex virus capsid protein VP26 to sites of procapsid maturation. *J.Virol.* 74(3):1468-1476.
22. Choi,T.; Huang,M.; Gorman,C.; Jaenisch,R. (1991). A generic intron increases gene expression in transgenic mice. *Mol.Cell Biol.* 11(6):3070-3074.
23. Cocchi,F.; Menotti,L.; Dubreuil,P.; Lopez,M.; Campadelli-Fiume,G. (2000). Cell-to-cell spread of wild-type herpes simplex virus type 1, but not of syncytial strains, is mediated by the immunoglobulin-like receptors that mediate virion entry, nectin1 (PRR1/HveC/HIgR) and nectin2 (PRR2/HveB). *J.Virol.* 74(8):3909-3917.
24. Cohen,G.H.; Long,D.; Eisenberg,R.J. (1980). Synthesis and processing of glycoproteins gD and gC of herpes simplex virus type 1. *J.Virol.* 36(2):429-439.
25. Condreay,J.P.; Witherspoon,S.M.; Clay,W.C.; Kost,T.A. (1999). Transient and stable gene expression in mammalian cells transduced with a recombinant baculovirus vector. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96(1):127-132.

26. Cormack,B.P.; Valdivia,R.H.; Falkow,S. (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173:33-38.
27. Cubitt,A.B.; Heim,R.; Adams,S.R.; Boyd,A.E.; Gross,L.A.; Tsien,R.Y. (1995). Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends. Biochem. Sci.* 20(11):448-455.
28. Davison,M.D.; Rixon,F.J.; Davison,A.J. (1992). Identification of genes encoding two capsid proteins (VP24 and VP26) of herpes simplex virus type 1. *J.Gen.Virol.* 73:2709-2713.
29. Degreve,B.; Esnouf,R.; De Clercq,E.; Balzarini,J. (1999). Characterization of multiple nuclear localization signals in herpes simplex virus type 1 thymidine kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264(2):338-342.
30. Desai,P.; Person,S. (1998). Incorporation of the green fluorescent protein into the herpes simplex virus type 1 capsid. *J.Virol.* 72(9):7563-7568.
31. Dingwell,K.S.; Johnson,D.C. (1998). The herpes simplex virus gE-gI complex facilitates cell-to-cell spread and binds to components of cell junctions. *J.Virol.* 72(11):8933-8942.
32. Dunn,J.J.; Studier,F.W. (1983). Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and the locations of T7 genetic elements. *J.Mol.Biol.* 166(4):477-535.
33. Elion,G.B. (1993). Acyclovir: discovery, mechanism of action, and selectivity. *J.Med.Virol. Suppl* 1:2-6.
34. Elliott,G.; O'Hare,P. (1999). Live-cell analysis of a green fluorescent protein-tagged herpes simplex virus infection. *J.Virol.* 73(5):4110-4119.
35. Felgner,P.L.; Gadek,T.R.; Holm,M.; Roman,R.; Chan,H.W.; Wenz,M.; Northrop,J.P.; Ringold,G.M.; Danielsen,M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 84(21):7413-7417.
36. Fenwick,M.L.; Walker,M.J. (1978). Suppression of the synthesis of cellular macromolecules by herpes simplex virus. *J.Gen.Virol.* 41(1):37-51.
37. Foster,T.P.; Chouljenko,V.N.; Kousoulas,K.G. (1999). Functional characterization of the HveA homolog specified by African green monkey kidney cells with a herpes simplex virus expressing the green. *Virology* 258(2):365-374.
38. Foster,T.P.; Rybachuk,G.V.; Kousoulas,K.G. (1998). Expression of the enhanced green fluorescent protein by herpes simplex virus type 1 (HSV-1) as an in vitro or in vivo marker for virus entry. *J.Virol.Methods* 75(2):151-160.

39. Furlong,D.; Swift,H.; Roizman,B. (1972). Arrangement of herpesvirus deoxyribonucleic acid in the core. *J.Virol.* 10(5):1071-1074.
40. Geraghty,R.J.; Krummenacher,C.; Cohen,G.H.; Eisenberg,R.J.; Spear,P.G. (1998). Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor. *Science* 280(5369):1618-1620.
41. Gershon,A.A.; Sherman,D.L.; Zhu,Z.; Gabel,C.A.; Ambron,R.T.; Gershon,M.D. (1994). Intracellular transport of newly synthesized varicella-zoster virus: final envelopment in the trans-Golgi network. *J.Virol.* 68(10):6372-6390.
42. Gerster,T.; Roeder,R.G. (1988). A herpesvirus trans-activating protein interacts with transcription factor OTF-1 and other cellular proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 85(17):6347-6351.
43. Glorioso,J.; Bender,M.A.; Fink,D.; DeLuca,N. (1995). Herpes simplex virus vectors. *Mol.Cell Biol.Hum.Dis.Ser.* 5:33-63.
44. Glorioso,J.C.; DeLuca,N.A.; Fink,D.J. (1995). Development and application of herpes simplex virus vectors for human gene therapy. *Annu.Rev.Microbiol.* 49:675-710.
45. Gronowski,A.M.; Hilbert,D.M.; Sheehan,K.C.; Garotta,G.; Schreiber,R.D. (1999). Baculovirus stimulates antiviral effects in mammalian cells. *J.Virol.* 73(12):9944-9951.
46. Haas,J.; Park,E.C.; Seed,B. (1996). Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein. *Curr.Biol.* 6(3):315-324.
47. Hagglund,R.; Munger,J.; Poon,A.P.; Roizman,B. (2002). U(S)3 protein kinase of herpes simplex virus 1 blocks caspase 3 activation induced by the products of U(S)1.5 and U(L)13 genes and modulates expression of transduced U(S)1.5 open reading frame in a cell type-specific manner. *J.Virol.* 76(2):743-754.
48. Hardwicke,M.A.; Sandri-Goldin,R.M. (1994). The herpes simplex virus regulatory protein ICP27 contributes to the decrease in cellular mRNA levels during infection. *J.Virol.* 68(8):4797-4810.
49. Hardy,W.R.; Sandri-Goldin,R.M. (1994). Herpes simplex virus inhibits host cell splicing, and regulatory protein ICP27 is required for this effect. *J.Virol.* 68(12):7790-7799.
50. Heim,R.; Tsien,R.Y. (1996). Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr.Biol.* 6(2):178-182.

51. Herold,B.C.; Visalli,R.J.; Susmarski,N.; Brandt,C.R.; Spear,P.G. (1994). Glycoprotein C-independent binding of herpes simplex virus to cells requires cell surface heparan sulphate and glycoprotein B. *J.Gen. Virol.* 75:1211-1222.
52. Hofmann,C.; Sandig,V.; Jennings,G.; Rudolph,M.; Schlag,P.; Strauss,M. (1995). Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 92(22):10099-10103.
53. Hofmann,C.; Strauss,M. (1998). Baculovirus-mediated gene transfer in the presence of human serum or blood facilitated by inhibition of the complement system. *Gene Ther.* 5(4):531-536.
54. Jacob,R.J.; Morse,L.S.; Roizman,B. (1979). Anatomy of herpes simplex virus DNA. XII. Accumulation of head-to-tail concatemers in nuclei of infected cells and their role in the generation of the four isomeric arrangements of viral DNA. *J.Virol.* 29(2):448-457.
55. Jenkins,F.J.; Roizman,B. (1986). Herpes simplex virus 1 recombinants with noninverting genomes frozen in different isomeric arrangements are capable of independent replication. *J.Virol.* 59(2):494-499.
56. Johnson,D.C.; Huber,M.T. (2002). Directed egress of animal viruses promotes cell-to-cell spread. *J.Virol.* 76(1):1-8.
57. Johnson,D.C.; Spear,P.G. (1982). Monensin inhibits the processing of herpes simplex virus glycoproteins, their transport to the cell surface, and the egress of virions from infected. *J.Virol.* 43(3):1102-1112.
58. Kang,C.Y. (1988). Baculovirus vectors for expression of foreign genes. *Adv.Virus Res.* 35:177-192.
59. Kitts,P.A.; Possee,R.D. (1993). A method for producing recombinant baculovirus expression vectors at high frequency. *Biotechniques* 14(5):810-817.
60. Kool,M.; Vlak,J.M. (1993). The structural and functional organization of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. *Arch.Virol.* 130(1-2):1-16.
61. Kotani,H.; Newton,P.B.,III; Zhang,S.; Chiang,Y.L.; Otto,E.; Weaver,L.; Blaese,R.M.; Anderson,W.F.; McGarrity,G.J. (1994). Improved methods of retroviral vector transduction and production for gene therapy. *Hum.Gene Ther.* 5(1):19-28.
62. Kristensson,K.; Lycke,E.; Roytta,M.; Svennerholm,B.; Vahlne,A. (1986). Neuritic transport of herpes simplex virus in rat sensory neurons in vitro. Effects of substances interacting with microtubular function and axonal flow [nocodazole, taxol and erythro-9-3-(2-hydroxyonyl)adenine]. *J.Gen. Virol.* 67:2023-2028.

63. Kovesdi,I.; Brough,D.E.; Bruder,J.T.; Wickham,T.J. (1997). Adenoviral vectors for gene transfer. *Curr.Opin.Biotechnol.* 8(5):583-589.
64. Kuhn,J.E.; Kramer,M.D.; Willenbacher,W.; Wieland,U.; Lorentzen,E.U.; Braun,R.W. (1990). Identification of herpes simplex virus type 1 glycoproteins interacting with the cell surface. *J.Virol.* 64(6):2491-2497.
65. Kurian,K.M.; Watson,C.J.; Wyllie,A.H. (2000). Retroviral vectors. *Mol.Pathol.* 53(4):173-176.
66. Lai,C.M.; Lai,Y.K.; Rakoczy,P.E. (2002). Adenovirus and adeno-associated virus vectors. *DNA Cell Biol.* 21(12):895-913.
67. Lam,Q.; Smibert,C.A.; Koop,K.E.; Lavery,C.; Capone,J.P.; Weinheimer,S.P.; Smiley,J.R. (1996). Herpes simplex virus VP16 rescues viral mRNA from destruction by the virion host shutoff function. *EMBO J.* 15(10):2575-2581.
68. Ledley,F.D. (1994). Non-viral gene therapy. *Curr.Opin.Biotechnol.* 5(6):626-636.
69. Ledley,F.D. (1995). Nonviral gene therapy: the promise of genes as pharmaceutical products. *Hum.Gene Ther.* 6(9):1129-1144.
70. Leisy,D.; Nesson,M.; Pearson,M.; Rohrmann,G.; Beaudreau,G. (1986). Location and nucleotide sequence of the *Orgyia pseudotsugata* single nucleocapsid nuclear polyhedrosis virus polyhedrin gene. *J.Gen.Virol.* 67:1073-1079.
71. Loimas,S.; Wahlfors,J.; Janne,J. (1998). Herpes simplex virus thymidine kinase-green fluorescent protein fusion gene: new tool for gene transfer studies and gene therapy. *Biotechniques* 24(4):614-618.
72. Lomonte,P.; Everett,R.D. (1999). Herpes simplex virus type 1 immediate-early protein Vmw110 inhibits progression of cells through mitosis and from G(1) into S phase of the cell. *J.Virol.* 73(11):9456-9467.
73. Lopez,P.; Jacob,R.J.; Roizman,B. (2002). Overexpression of promyelocytic leukemia protein precludes the dispersal of ND10 structures and has no effect on accumulation of infectious herpes simplex virus 1 or its proteins. *J.Virol.* 76(18):9355-9367.
74. Lorentzen,E.U.; Eing,B.R.; Hafezi,W.; Manservigi,R.; Kuhn,J.E. (2001). Replication-competent herpes simplex virus type 1 mutant expressing an autofluorescent glycoprotein H fusion protein. *Intervirology* 44(4):232-242.
75. Lundstrom,K. (2000). Alphavirus vectors: applications for DNA vaccine production and gene expression. *Intervirology* 43(4-6):247-257.
76. Mannino,R.J.; Gould-Fogerite,S. (1988). Liposome mediated gene transfer. *Biotechniques* 6(7):682-690.

77. Mavromara-Nazos,P.; Roizman,B. (1987). Activation of herpes simplex virus 1 gamma 2 genes by viral DNA replication. *Virology* 161(2):593-598.
78. McGeoch,D.J.; Dalrymple,M.A.; Davison,A.J.; Dolan,A.; Frame,M.C.; McNab,D.; Perry,L.J.; Scott,J.E.; Taylor,P. (1988). The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *J.Gen.Virol.* 69:1531-1574.
79. McGeoch,D.J.; Dolan,A.; Donald,S.; Brauer,D.H. (1986). Complete DNA sequence of the short repeat region in the genome of herpes simplex virus type 1. *Nucleic Acids Res.* 14(4):1727-1745.
80. McNabb,D.S.; Courtney,R.J. (1992). Identification and characterization of the herpes simplex virus type 1 virion protein encoded by the UL35 open reading frame. *J.Virol.* 66(5):2653-2663.
81. McNabb,D.S.; Courtney,R.J. (1992). Posttranslational modification and subcellular localization of the p12 capsid protein of herpes simplex virus type 1. *J.Virol.* 66(8):4839-4847.
82. Mettenleiter,T.C. (2002). Herpesvirus assembly and egress. *J.Virol.* 76(4):1537-1547.
83. Miyawaki,A.; Llopis,J.; Heim,R.; McCaffery,J.M.; Adams,J.A.; Ikura,M.; Tsien,R.Y. (1997). Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* 388(6645):882-887.
84. Miyazaki,J.; Takaki,S.; Araki,K.; Tashiro,F.; Tominaga,A.; Takatsu,K.; Yamamura,K. (1989). Expression vector system based on the chicken beta-actin promoter directs efficient production of interleukin-5. *Gene* 79(2):269-277.
85. Montgomery,R.I.; Warner,M.S.; Lum,B.J.; Spear,P.G. (1996). Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* 87(3):427-436.
86. Moore,P.S.; Chang,Y. (1995). Detection of herpesvirus-like DNA sequences in Kaposi's sarcoma in patients with and without HIV infection. *N.Engl.J.Med.* 332(18):1181-1185.
87. Moss,B. (1996). Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93(21):11341-11348.
88. Munger,J.; Chee,A.V.; Roizman,B. (2001). The U(S)3 protein kinase blocks apoptosis induced by the d120 mutant of herpes simplex virus 1 at a premitochondrial stage. *J.Virol.* 75(12):5491-5497.

89. Neda,H.; Wu,C.H.; Wu,G.Y. (1991). Chemical modification of an ecotropic murine leukemia virus results in redirection of its target cell specificity. *J.Biol.Chem.* 266(22):14143-14146.
90. Nishioka,Y.; Silverstein,S. (1977). Degradation of cellular mRNA during infection by herpes simplex virus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 74(6):2370-2374.
91. Nishioka,Y.; Silverstein,S. (1978). Requirement of protein synthesis for the degradation of host mRNA in Friend erythroleukemia cells infected with herpes simplex virus type 1. *J.Virol.* 27(3):619-627.
92. Novy,R. (1999). pTriEx™-1 Multisystem Vector for protein expression in E.coli, mammalian, and insect cells. inNovations 10 (www.novagen.com).
93. Overton,H.; McMillan,D.; Hope,L.; Wong,Kai,I (1994). Production of host shutoff-defective mutants of herpes simplex virus type 1 by inactivation of the UL13 gene. *Virology* 202(1):97-106.
94. Paoletti,E. (1996). Applications of pox virus vectors to vaccination: an update. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93(21):11349-11353.
95. Penfold,M.E.; Armati,P.; Cunningham,A.L. (1994). Axonal transport of herpes simplex virions to epidermal cells: evidence for a specialized mode of virus transport and assembly. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 91(14):6529-6533.
96. Petitclerc,D.; Attal,J.; Theron,M.C.; Bearzotti,M.; Bolifraud,P.; Kann,G.; Stinnakre,M.G.; Pointu,H.; Puissant,C.; Houdebine,L.M. (1995). The effect of various introns and transcription terminators on the efficiency of expression vectors in various cultured cell lines and in the mammary gland of transgenic mice. *J.Biotechnol.* 40(3):169-178.
97. Potter,H. (1993). Application of electroporation in recombinant DNA technology. *Methods Enzymol.* 217:461-478.
98. Prasher,D.C.; Eckenrode,V.K.; Ward,W.W.; Prendergast,F.G.; Cormier,M.J. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111(2):229-233.
99. Rixon,F.J.; Addison,C.; McGregor,A.; Macnab,S.J.; Nicholson,P.; Preston,V.G.; Tatman,J.D. (1996). Multiple interactions control the intracellular localization of the herpes simplex virus type 1 capsid proteins. *J.Gen.Virol.* 77:2251-2260.
100. Roizman,B. (1979). The structure and isomerization of herpes simplex virus genomes. *Cell* 16(3):481-494.
101. Roizman,B.; Borman,G.S.; Roust,M.K. (1965). Macromolecular synthesis in cells infected with herpes simplex virus. *Nature* 206(991):1374-1375.

102. Roizman, B. and A. E. Sears (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.
103. Roller, R.J.; Zhou, Y.; Schnetzer, R.; Ferguson, J.; DeSalvo, D. (2000). Herpes simplex virus type 1 U(L)34 gene product is required for viral envelopment. *J. Virol.* 74(1):117-129.
104. Roop, C.; Hutchinson, L.; 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. *J. Virol.* 67(4):2285-2297.
105. Scangos, G.; Ruddle, F.H. (1981). Mechanisms and applications of DNA-mediated gene transfer in mammalian cells - a review. *Gene* 14(1-2):1-10.
106. Schek, N.; Bachenheimer, S.L. (1985). Degradation of cellular mRNAs induced by a virion-associated factor during herpes simplex virus infection of Vero cells. *J. Virol.* 55(3):601-610.
107. Schirmer, E.C.; Wyatt, L.S.; Yamanishi, K.; Rodriguez, W.J.; Frenkel, N. (1991). Differentiation between two distinct classes of viruses now classified as human herpesvirus 6. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 88(13):5922-5926.
108. Schmelter, J.; Knez, J.; Smiley, J.R.; Capone, J.P. (1996). Identification and characterization of a small modular domain in the herpes simplex virus host shutoff protein sufficient for interaction with VP16. *J. Virol.* 70(4):2124-2131.
109. Sciortino, M.T.; Taddeo, B.; Poon, A.P.; Mastino, A.; Roizman, B. (2002). Of the three tegument proteins that package mRNA in herpes simplex virions, one (VP22) transports the mRNA to uninfected cells for expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 99(12):8318-8323.
110. Sheldrick, P.; Berthelot, N. (1975). Inverted repetitions in the chromosome of herpes simplex virus. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 39:667-678.
111. Shoji, I.; Aizaki, H.; Tani, H.; Ishii, K.; Chiba, T.; Saito, I.; Miyamura, T.; Matsuura, Y. (1997). Efficient gene transfer into various mammalian cells, including non-hepatic cells, by baculovirus vectors. *J. Gen. Virol.* 78:2657-2664.
112. Shukla, D.; Liu, J.; Blaiklock, P.; Shworak, N.W.; Bai, X.; Esko, J.D.; Cohen, G.H.; Eisenberg, R.J.; Rosenberg, R.D.; Spear, P.G. (1999). A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell* 99(1):13-22.
113. Sivropoulou, A.; Arsenakis, M. (1993). Regulation of glycoprotein D synthesis of herpes simplex virus 1 by alpha 4 protein, the major regulatory protein of the virus, in stably transformed cell lines: effect of the relative gene copy numbers. *Arch. Virol.* 131(1-2):153-168.

114. Skepper,J.N.; Whiteley,A.; Browne,H.; Minson,A. (2001). Herpes simplex virus nucleocapsids mature to progeny virions by an envelopment --> deenvelopment --> reenvelopment pathway. *J.Virol.* 75(12):5697-5702.
115. Smibert,C.A.; Johnson,D.C.; Smiley,J.R. (1992). Identification and characterization of the virion-induced host shutoff product of herpes simplex virus gene UL41. *J.Gen.Virol.* 73:467-470.
116. Sodeik,B. (2000). Mechanisms of viral transport in the cytoplasm. *Trends Microbiol.* 8(10):465-472.
117. Spear,P.G.; Eisenberg,R.J.; Cohen,G.H. (2000). Three classes of cell surface receptors for alphaherpesvirus entry. *Virology* 275(1):1-8.
118. Stackpole,C.W. (1969). Herpes-type virus of the frog renal adenocarcinoma. I. Virus development in tumor transplants maintained at low temperature. *J.Virol.* 4(1):75-93.
119. Stearns,T. (1995). Green fluorescent protein. The green revolution. *Curr.Biol.* 5(3):262-264.
120. Stevens,J.G. (1989). Human herpesviruses: a consideration of the latent state. *Microbiol.Rev.* 53(3):318-332.
121. Strom,T.; Frenkel,N. (1987). Effects of herpes simplex virus on mRNA stability. *J.Virol.* 61(7):2198-2207.
122. Subak-Sharpe,J.H.; Dargan,D.J. (1998). HSV molecular biology: general aspects of herpes simplex virus molecular biology. *Virus Genes* 16(3):239-251.
123. Sydiskis,R.J.; Roizman,B. (1966). Polysomes and protein synthesis in cells infected with a DNA virus. *Science* 153(731):76-78.
124. Volkman,L.; Goldsmith,P. (1983). In vitro survey of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus interaction with nontarget vertebrate host cells. *Applied and Environmental Microbiology* 45(3):1085-1093.
125. Wadsworth,S.; Jacob,R.J.; Roizman,B. (1975). Anatomy of herpes simplex virus DNA. II. Size, composition, and arrangement of inverted terminal repetitions. *J.Virol.* 15(6):1487-1497.
126. Ward,P.L.; Ogle,W.O.; Roizman,B. (1996). Assemblons: nuclear structures defined by aggregation of immature capsids and some tegument proteins of herpes simplex virus 1. *J.Virol.* 70(7):4623-4631.

127. Warner,M.S.; Geraghty,R.J.; Martinez,W.M.; Montgomery,R.I.; Whitbeck,J.C.; Xu,R.; Eisenberg,R.J.; Cohen,G.H.; Spear,P.G. (1998). A cell surface protein with herpesvirus entry activity (HveB) confers susceptibility to infection by mutants of herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2, and pseudorabies virus. *Virology* 246(1):179-189.
128. Weir,J.P. (2001). Regulation of herpes simplex virus gene expression. *Gene* 271(2):117-130.
129. Whealy,M.E.; Card,J.P.; Meade,R.P.; Robbins,A.K.; Enquist,L.W. (1991). Effect of brefeldin A on alphaherpesvirus membrane protein glycosylation and virus egress. *J.Virol.* 65(3):1066-1081.
130. Whitbeck,J.C.; Peng,C.; Lou,H.; Xu,R.; Willis,S.H.; Ponce,de Leon; 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.; 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. *J.Virol.* 71(8):6083-6093.
131. Whiteley,A.; Bruun,B.; Minson,T.; Browne,H. (1999). Effects of targeting herpes simplex virus type 1 gD to the endoplasmic reticulum and trans-Golgi network. *J.Virol.* 73(11):9515-9520.
132. Wickham,T.J.; Segal,D.M.; Roelvink,P.W.; Carrion,M.E.; Lizonova,A.; Lee,G.M.; Kovesdi,I. (1996). Targeted adenovirus gene transfer to endothelial and smooth muscle cells by using bispecific antibodies. *J.Virol.* 70(10):6831-6838.
133. Wigler,M.; Sweet,R.; Sim,G.K.; Wold,B.; Pellicer,A.; Lacy,E.; Maniatis,T.; Silverstein,S.; Axel,R. (1979). Transformation of mammalian cells with genes from procaryotes and eucaryotes. *Cell* 16(4):777-785.
134. Wingfield,P.T.; Stahl,S.J.; Thomsen,D.R.; Homa,F.L.; Booy,F.P.; Trus,B.L.; 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. *J.Virol.* 71(12):8955-8961.
135. WuDunn,D.; Spear,P.G. (1989). Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. *J.Virol.* 63(1):52-58.
136. Yang,N.S.; Burkholder,J.; Roberts,B.; Martinell,B.; McCabe,D. (1990). In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87(24):9568-9572.
137. Yang,T.T.; Sinai,P.; Kitts,P.A.; Kain,S.R. (1997). Quantification of gene expression with a secreted alkaline phosphatase reporter system. *Biotechniques* 23(6):1110-1114.

138. Yeh,P.; Perricaudet,M. (1997). Advances in adenoviral vectors: from genetic engineering to their biology. *FASEB J.* 11(8):615-623.
139. Zabner,J.; Fasbender,A.J.; Moninger,T.; Poellinger,K.A.; Welsh,M.J. (1995). Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J.Biol.Chem.* 270(32):18997-19007.
140. Zelus,B.D.; Stewart,R.S.; Ross,J. (1996). The virion host shutoff protein of herpes simplex virus type 1: messenger ribonucleolytic activity in vitro. *J.Virol.* 70(4):2411-2419.
141. Zhou,G.; Galvan,V.; Campadelli-Fiume,G.; Roizman,B. (2000). Glycoprotein D or J delivered in trans blocks apoptosis in SK-N-SH cells induced by a herpes simplex virus 1 mutant lacking intact genes. *J.Virol.* 74(24):11782-11791.
142. Zolotukhin,S.; Potter,M.; Hauswirth,W.W.; Guy,J.; Muzyczka,N. (1996). A "humanized" green fluorescent protein cDNA adapted for high-level expression in mammalian cells. *J.Virol.* 70(7):4646-4654.

Herrn Prof. Dr. J. E. Kühn danke ich herzlich für die Überlassung des Themas sowie für die ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung bei Planung und Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Bodo Eing, Frau Dr. Eva Lorentzen, Herrn Dr. Wali Hafezi und Dr. Lars Lippelt danke ich besonders für ständige Hilfsbereitschaft, wertvolle Diskussionen und für hilfreiche Ratschläge in technischen Fragen.

Mein Dank gilt Frau Hovens, Frau Romberg und allen Mitarbeitern des Institutes für Klinische Virologie für die Unterstützung im Labor und das angenehme Arbeitsklima.

Meiner Familie und Lolita Gemar möchte ich ganz herzlich für ihre Hilfe danken.

Name:	Andreas Heid	
Geburtsdatum:	12.11.1974	
Geburtsort:	Asanovo (UdSSR)	
Familienstand:	ledig	
Schulbesuch:	1980-1991	Grund- und Gesamtschule in Asanovo
	1991-1992	Sprachkurs der Otto Beneke Stiftung in Anrath
	1992-1994	Eichendorf-Kolleg, Geilenkirchen
	5/1994	Erwerb der allgemeinen Hochschulreife
Zivildienst:	1994-1995	Jakobi-Krankenhaus Rheine
Studium:	10/1995	Einschreibung an der WWU Münster im Fach Humanmedizin
	8/1997	Ärztliche Vorprüfung
	8/1998	1. Staatsexamen
		Beginn des experimentellen Teils der Dissertation (Institut für Medizinische Mikrobiologie WWU Münster)
	10/2000	Abschluss des experimentellen Teils der Dissertation
	3/2001	2. Staatsexamen
	2001-2002	praktisches Jahr in Klinikum Minden, Wahlfach Gynäkologie
	5/2002	3. Staatsexamen
Arzt im Praktikum	6/2002-4/2003	Frauenklinik Minden
	5/2003	Frauenklinik Mathias-Spital Rheine

Rheine, den 05.08.03