

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Charakterisierung von Virus- und Wirtsfaktoren mit Funktionen bei der Membranhüllung von Herpes-simplex-Virus 1



Melanie Ott
aus
München

2011

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 (in der Fassung der sechsten Änderungssatzung vom 16. August 2010) von Frau PD Dr. Susanne Bailer betreut und von Herrn Prof. Dr. Klaus Förstemann von der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, 20.09.2011

Melanie Ott

Dissertation eingereicht am 20.09.2011

1. Gutachter Prof. Dr. Klaus Förstemann

2. Gutachterin PD Dr. Susanne Bailer

Mündliche Prüfung am 10.11.2011

Für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. EINLEITUNG.....	5
2.1. Die Familie der Herpesviren.....	5
2.2. Das Herpes-simplex-Virus 1 (HSV-1).....	6
2.2.1. Aufbau des Viruspartikels	7
2.2.2. Das Genom	8
2.2.3. Die Virusreplikation	9
2.2.3.1. Eintritt der Viruspartikel ins Innere der Wirtszelle (<i>entry</i>).....	10
2.2.3.2. Transport zum Zellkern	11
2.2.3.3. Genexpression und Replikation des Virus-Genoms	11
2.2.3.4. Zusammenbau des Nukleocapsids	12
2.2.3.5. Primäre Umhüllung und Auswanderung aus dem Zellkern (<i>nuclear egress</i>)	13
2.2.3.6. Tegumentation und sekundäre Umhüllung	15
2.2.3.7. Freisetzung reifer Virionen aus der Wirtszelle	16
2.2.3.8. Virusausbreitung mittels Zell-Zell-Kontakt.....	16
2.3. Zielsteuerung der NEC-Proteine von HSV-1	16
2.3.1. Der Kernauswanderungskomplex (NEC) von HSV-1	17
2.3.2. Der klassische Kernimport von Proteinen	18
2.3.3. Die Biogenese von <i>tail anchor</i> Proteinen	22
2.4. Bedeutung von NEC-interagierenden Wirtsfaktoren für die herpesvirale Replikation	24
2.4.1. Der Asna1/TRC40-vermittelte Insertionsweg für TA-Proteine	25
2.4.2. Das Phospholipid Scramblase 1 (PLSCR1) Protein.....	27
2.5. Zielsetzung der Arbeit.....	29
3. MATERIAL UND METHODEN	31
3.1. Material.....	31
3.1.1. Laborgeräte und Software	31
3.1.2. Chemikalien	32
3.1.3. Verbrauchsmaterialien.....	33
3.1.4. Fertigsätze (Kits)	34
3.1.5. Enzyme und Molekulargewichtsstandards.....	34
3.1.6. Antikörper und Seren.....	35
3.1.6.1. Primäre Antikörper	35
3.1.6.2. Sekundäre Antikörper.....	36

3.1.7. Oligonukleotide.....	36
3.1.7.1. Oligonukleotide für die Rekombinationsklonierung	36
3.1.7.2. Oligonukleotide für die Herstellung von Expressionsvektoren	36
3.1.7.3. Oligonukleotide für die Herstellung von Klonierungsvektoren	37
3.1.7.4. Oligonukleotide für die zielgerichtete Mutagenese	37
3.1.7.5. Oligonukleotide für die BAC-Mutagenese	38
3.1.7.6. Oligonukleotide für die Quantifizierung von HSV-1 Genomkopien	38
3.1.7.7. Oligonukleotide für die Quantifizierung von Transkripten (TaqMan)	38
3.1.7.8. siRNA-Oligonukleotide	39
3.1.8. Plasmide	39
3.1.8.1. Gateway®-kompatible Leervektoren.....	39
3.1.8.2. Gateway®-kompatible Vektorkonstrukte.....	39
3.1.8.3. Expressionsvektoren	40
3.1.8.4. Klonierungsvektoren.....	41
3.1.8.5. HSV-1 BAC	42
3.1.9. Bakterienstämme	43
3.1.10. Hefestämme	43
3.1.11. Säugerzelllinien	43
3.1.12. Viren.....	43
3.2. Methoden	44
3.2.1. Bakterienkultur	44
3.2.1.1. Kultivierung von Bakterien	44
3.2.1.2. Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien	44
3.2.1.3. Transformation chemisch-kompetenter Bakterien	45
3.2.1.4. Herstellung elektro- und rekombinations-kompetenter Bakterien.....	45
3.2.1.5. Transformation elektro- und rekombinations-kompetenter Bakterien.....	45
3.2.2. Hefekultur	46
3.2.2.1. Kultivierung von Hefen	46
3.2.2.2. Herstellung chemisch-kompetenter Hefen	46
3.2.2.3. Transformation chemisch-kompetenter Hefen	46
3.2.3. Zellkultur.....	47
3.2.3.1. Kultivierung eukaryotischer Zellen	47
3.2.3.2. Dauerkultur eukaryotischer Zellen	47
3.2.3.3. Transfektion eukaryotischer Zellen	47
3.2.3.3.1. Transfektion von Plasmid bzw. BAC DNA	47
3.2.3.3.2. Transfektion von siRNA	48
3.2.4. Virologische Methoden	48
3.2.4.1. Herstellung von Virusstocks	48
3.2.4.2. Virusinfektion eukaryotischer Zellen	49
3.2.4.3. <i>Plaque Assay</i>	49
3.2.4.4. Wachstumskinetik	50

3.2.4.5. Echtzeit-PCR-Quantifizierung von viralem Genom (<i>realtime</i> qPCR).....	50
3.2.4.6. Echtzeit-PCR-Quantifizierung von viralen RNA-Transkripten mittels TaqMan-PCR	50
3.2.5. Molekularbiologische Methoden	51
3.2.5.1. Präparation von Plasmid DNA (<i>Mini-Präp.</i>)	51
3.2.5.2. Präparation von BAC DNA (<i>BAC Mini-Präp.</i>)	51
3.2.5.3. Präparation von Plasmid und BAC DNA (<i>Midi-Präp.</i>).....	52
3.2.5.4. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	52
3.2.5.5. Restriktionsanalyse von DNA.....	52
3.2.5.6. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	53
3.2.5.7. Zielgerichtete Mutagenese	53
3.2.5.8. Agarose-Gelelektrophorese	53
3.2.5.9. Aufreinigung von DNA-Fragmenten	53
3.2.5.10. 5'-Dephosphorylierungsreaktion	54
3.2.5.11. Ligation.....	54
3.2.5.12. Rekombinationsklonierung (Gateway® Klonierung)	54
3.2.5.13. Sequenzierung von DNA.....	54
3.2.6. BAC Mutagenese	55
3.2.6.1. BAC Mutagenese mittels <i>galK</i> -kan Selektion	55
3.2.6.2. Herstellung von rekombinanten HSV-1 BAC	56
3.2.7. Biochemische Methoden	58
3.2.7.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	58
3.2.7.2. Proteintransfer und Immunoblot.....	59
3.2.7.3. Modifizierter LUMIER Assay	59
3.2.8. Hefegenetische Methoden.....	61
3.2.8.1. Hefe-2-Hybridsystem (<i>Yeast-2-Hybrid</i> , Y2H).....	61
3.2.9. Mikroskopische Methoden	62
3.2.9.1. Indirekte Immunofluoreszenz (IF)	62
3.2.9.2. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....	62
4. ERGEBNISSE.....	63
4.1. Funktionale Charakterisierung des UL34 <i>tail anchors</i>.....	63
4.1.1. Herstellung von HSV-1 UL34 TA-Mutanten	63
4.1.2. Analyse der TMD-Deletionen von UL34.....	66
4.1.3. Analyse der TMD-Permutationen von UL34	69
4.1.4. Analyse der TMD-flankierenden positiven Ladungen von UL34.....	73
4.2. Kerntransport der NEC-Proteine von HSV-1.....	75
4.2.1. Funktionale Analyse der NLS Sequenz von HSV-1 UL34.....	75
4.2.1.1. Die UL34 NLS ist für die Virusreplikation nicht essentiell	76
4.2.2. Funktionale Analyse der NLS Sequenz von HSV-1 UL31	77
4.2.2.1. Die UL31 NLS ist für den Kernimport funktional und essentiell	78
4.2.2.2. Herstellung von HSV-1 UL31 NLS Mutanten.....	79

4.2.2.3. Die UL31 NLS enthält eine für die Virusreplikation essentielle Funktion	81
4.2.2.4. Die UL31 NLS ist spät in der Infektion für den Kernimport der NEC-Proteine redundant	83
4.2.3. Simultane Analyse der UL31 und UL34 NLS im viralen Kontext	85
4.2.3.1. Die simultane NLS Mutagenese beider NEC-Proteine beeinträchtigt deren Kernimport.....	85
4.3. Virus-Wirt-Interaktionen der HSV-1 NEC-Proteine	87
4.3.1. Bedeutung des TA-Insertionsfaktors Asna1 für die HSV-1 Replikation	87
4.3.1.1. Asna1 interagiert spezifisch mit den HSV-1 kodierten TA-Proteinen	88
4.3.1.2. <i>Silencing</i> der Asna1 Expression mittels RNA Interferenz	89
4.3.1.3. Asna1 hat keinen Einfluss auf die Zielsteuerung sowie Membraninsertion der HSV-1 TA-Proteine.....	90
4.3.1.4. Asna1 ist für die effiziente Auswanderung der neu gebildeten HSV-1 Virionen wichtig.....	91
4.3.2. Phospholipid Scramblase 1 – Implikationen für den herpesviralen Replikationsverlauf	95
4.3.2.1. PLSCR1 interagiert spezifisch mit mehreren HSV-1 Proteinen	95
4.3.2.2. Eingrenzung der Interaktionsdomäne von PLSCR1 mit den HSV-1 Proteinen	97
4.3.2.3. Eingrenzung der Interaktionsdomäne von HSV-1 UL34 mit PLSCR1	98
4.3.2.4. HSV-1 induziert die subzelluläre Umverteilung von PLSCR1	99
4.3.2.5. <i>Silencing</i> der PLSCR1 Expression mittels RNA Interferenz	101
4.3.2.6. PLSCR1 spielt keine Rolle beim Eintritt der HSV-1 Virionen in die Wirtszelle	102
4.3.2.7. PLSCR1 wird für die effiziente HSV-1 Vermehrung benötigt.....	103
4.3.2.8. PLSCR1 beeinflusst die Bildung von neuen HSV-1 Virionen	105
4.3.2.9. PLSCR1 spielt eine Rolle bei der Auswanderung der HSV-1 Virionen	108
5. DISKUSSION	111
5.1. Der essentielle <i>tail anchor</i> von UL34 – mögliche Funktionen beim <i>nuclear egress</i>	111
5.2. Bedeutung des klassischen Kernimports für die Zielsteuerung der HSV-1 NEC-Proteine	116
5.2.1. Die UL34 NLS ist im viralen Kontext nicht essentiell.....	116
5.2.2. Die UL31 NLS ist eine für die Virusreplikation essentielle Sequenz.....	117
5.2.3. Die simultane NLS Mutagenese führt zu beeinträchtigtem Kernimport der NEC- Proteine.....	120
5.3. Einfluss von Wirtsfaktoren auf die herpesvirale Replikation	121
5.3.1. Der potentielle TA-Insertionsfaktor Asna1 greift spät in den HSV-1 Replikationszyklus ein	122
5.3.2. PLSCR1 – ein multifunktionaler Wirtsfaktor der HSV-1 Infektion	125
6. LITERATURVERZEICHNIS	129
7. ANHANG	140

7.1. Abkürzungsverzeichnis	140
7.2. Publikationen und Präsentationen	144
7.3. Danksagung	145
7.4. Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1. ZUSAMMENFASSUNG

Das Herpes-simplex-Virus 1 (HSV-1), ein humanpathogener Vertreter der *α -Herpesvirinae*, ist ein umhülltes, großes DNA-Virus, welches eine latente Infektion der sensorischen Neuronen verursacht. Die normalerweise mit milden Symptomen einhergehende periodische Reaktivierung kann bei Neugeborenen oder immunsupprimierten Personen zum Teil auch zu schwerwiegenden Erkrankungen führen. Für ein besseres Verständnis der HSV-1 Pathogenese ist jedoch die Aufklärung von viralen sowie zellulären Prozessen, welche für den herpesviralen Lebenszyklus essentiell sind, unabdingbar. Die Auswanderung der reifen Capside aus dem Zellkern ist ein solcher entscheidender Prozess der Virus-Morphogenese. Dieser wird durch die konservierten Proteine UL34 und UL31 vermittelt, welche zusammen den Kernauswanderungskomplex (NEC) bilden. Die Verankerung des NEC an der inneren Kernmembran (INM) erfolgt dabei über UL34, einem potentiellen *tail anchor* (TA) Protein, welches post-translational in seine Zielmembran inseriert wird. In dieser Arbeit sollte die Zielsteuerung der HSV-1 NEC-Proteine zur INM im viralen Kontext mit Hilfe der BAC Mutagenese sowie der Einfluss von interagierenden Wirtsfaktoren untersucht werden.

Die funktionale Charakterisierung des essentiellen TA von HSV-1 UL34 zeigte, dass eine minimale TA-Länge von 15 Aminosäuren für die Zielsteuerung von UL34 zur INM sowie Ausbildung eines funktionalen NEC während der Virusreplikation ausreichend ist. Desweiteren konnte der UL34 TA mit entsprechenden Regionen von anderen herpesviralen oder zellulären TA-Proteinen mit unterschiedlichen Sequenzen und Hydrophobizitäten ohne Funktionsverlust ausgetauscht werden, während ein alternativer INM-Verankerungsmechanismus nicht toleriert wurde. Die positiv-geladenen flankierenden Sequenzbereiche des UL34 TA wurden im Gegensatz zu zellulären TA-Proteinen für die Zielsteuerung sowie Funktion nicht benötigt, so dass der UL34 TA diesbezüglich keine sequenz-spezifischen Informationen enthält. Mit dieser Studie konnten erste mechanistische Einblicke in die genaue Rolle des UL34 TA bei der Zielsteuerung zur INM sowie der Capsidauswanderung aus dem Zellkern gewonnen werden.

Für die HSV-1 NEC-Proteine UL34 und UL31 konnte jeweils eine NLS Sequenz identifiziert werden, welche in Abwesenheit von anderen viralen Faktoren wichtige Kriterien einer funktionalen NLS erfüllen. Im Viruskontext war die NLS von UL34 für die nukleäre Lokalisation sowie Funktion beider NEC-Proteine redundant, die leicht reduzierte Wachstumskinetik der UL34 NLS Virusmutante könnte durch eine beeinträchtigte Transportdynamik des UL34 Proteins verursacht werden. Die NLS Mutagenese des UL31 Proteins führte zu einem Replikationsdefekt, hatte aber keine Auswirkung auf die Kernlokalisierung der NEC-Proteine in einer späten Phase der Infektion, so dass die UL31 NLS Sequenz vermutlich zu einem frühen Zeitpunkt der Virusreplikation essentiell ist. Die simultane NLS

Mutagenese beider NEC-Proteine führte hingegen zu beeinträchtigtem Kernimport beider Proteine, was mit nukleärem Coimport oder Coretention der NEC-Proteine im Cytoplasma erklärt werden kann.

Da über die Rolle von beteiligten Wirtsfaktoren am Kernauswanderungsprozess der Capside erst wenig bekannt ist, lag ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit in der funktionalen Analyse der zwei mit dem NEC-interagierenden Wirtspoteine Asna1, einem wichtigen Faktor bei der Biogenese von TA-Proteinen, sowie der multifunktionalen Phospholipid Scramblase 1 (PLSCR1). Die Depletion dieser zellulären Proteine mittels RNA Interferenz führte in beiden Fällen zu einer deutlichen Reduktion in der Freisetzung von reifen Viruspartikeln. Obwohl Asna1 spezifisch mit den drei HSV-1 kodierten TA-Proteine UL34, UL56 und US9 interagiert, wird es für ihre korrekte Zielsteuerung nicht benötigt. Desweiteren hatte Asna1 keinen Einfluss auf den Virus-Eintritt, die herpesvirale Genexpression sowie die Bildung und Infektiosität von Viruspartikeln, jedoch auf deren Freisetzung ins extrazelluläre Milieu. PLSCR1 ist hingegen gleich an mehreren viralen Prozessen beteiligt. Während der Virus-Eintritt ungestört ablief, wurde in Abwesenheit von PLSCR1 eine starke Beeinträchtigung der herpesviralen Genexpression, eine veränderte Kernhüllenstruktur sowie ein Defekt in der späten Morphogenese beobachtet, welche kumulativ zu reduzierter Partikelbildung und Infektiosität der freigesetzten HSV-1 Virionen führten.

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit neue mechanistische Einsichten in den essentiellen NEC von HSV-1 gewonnen sowie zwei für die Virusreplikation wichtige Wirtsfaktoren identifiziert werden, welche in Zukunft alternative Angriffspunkte für antivirale Therapien darstellen könnten.

SUMMARY

Herpes simplex virus 1 (HSV-1), a large enveloped DNA virus, is a human pathogen belonging to the *α -herpesvirinae* that causes latent infections in sensory neurons. While reactivation leads to recurrent infections usually associated with mild symptoms it can cause serious diseases in newborn or immunocompromised individuals. Detailed investigation of both viral and cellular processes which are essential for the herpesviral life cycle is indispensable for a better understanding of the HSV-1 pathogenicity. Nuclear egress of mature capsids from the host nucleus is such a crucial process during virus morphogenesis which relies on the nuclear egress complex (NEC) consisting of the two conserved and essential viral proteins UL34 and UL31. Anchoring of the NEC at the inner nuclear membrane (INM) is thereby carried out by UL34, a potential tail anchor (TA) protein, which is post-translationally inserted into its target membrane. The aim of this study was to analyse the targeting of the HSV-1 NEC proteins to the INM in the viral context using BAC mutagenesis as well as the influence of interacting host factors.

Functional characterization of the essential TA of HSV-1 UL34 showed that a minimal tail length of 15 residues is sufficient for targeting to the INM and functional NEC formation in the viral context. Permutation of the UL34 TA with corresponding regions of other herpesviral or cellular TA proteins revealed that nuclear egress tolerates TA varying in sequence and hydrophobicity while an unrelated INM anchoring mechanism failed to complement the UL34 function. Unlike cellular TA proteins, positively charged regions flanking the UL34 TA were not required for targeting and function suggesting that they do not carry sequence specific targeting information. In conclusion, this study provided first mechanistic insights into the particular role of the TA of UL34 in targeting to the INM and capsid egress from the nucleus.

Both HSV-1 NEC proteins UL34 and UL31 contain a nuclear localization signal (NLS) which meets all important criteria of a functional NLS in absence of any other viral factor. In the viral context the UL34 NLS was redundant for nuclear localization and function of the NEC proteins, the slightly reduced growth kinetic of the UL34 NLS virus mutant might suggest an impaired transport dynamic of the UL34 protein. While site directed mutagenesis of the UL31 NLS in the viral context caused replication defects it did not interfere with nuclear localization of either of the NEC proteins in the late phase of infection suggesting its function is essential during an earlier step of viral replication. Simultaneous NLS mutagenesis of UL34 and UL31 resulted in compromised nuclear import of both proteins indicating their coimport or coretention in the cytoplasm.

Since little is known about the role of cellular factors involved in nuclear egress of newly assembled capsids, another focus of this study was to functionally characterize the NEC-

interacting host proteins Asna1, a critical factor during TA protein biogenesis, as well as the multifunctional phospholipid scramblase 1 (PLSCR1). One-step growth curves showed that in both cases depletion of the cellular protein by small interfering RNA (siRNA) considerably reduced virus propagation and release of mature HSV-1 virions. While Asna1 specifically interacted with all three HSV-1 encoded TA proteins UL34, UL56 and US9 it was neither required for membrane targeting nor insertion. Furthermore depletion of Asna1 did not affect early steps of the HSV-1 replication like virus entry into the host cell, herpesviral gene expression or formation and infectivity but efficient release of viral particles into the extracellular milieu. In contrast PLSCR1 is involved in several viral processes. While virus entry was normal in absence of PLSCR1 further experiments showed a significant impairment of herpesviral gene expression, a conspicuous deformation of the nuclear envelope structure and a defect in the late phase of virus morphogenesis which cumulatively resulted in released HSV-1 particles reduced in numbers and infectivity.

In summary, this study provided new mechanistic insights into the essential NEC of HSV-1 and identified two host factors which play important roles during viral replication and therefore might represent alternative targets for antiviral drug discovery in the future.

2. EINLEITUNG

2.1. Die Familie der Herpesviren

Die Familie der Herpesviren (*Herpesviridae*) gehört zu der im Jahre 2009 vom *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) eingeführten neuen Ordnung *Herpesvirales*. Diese besteht aus drei Familien, den *Alloherpesviridae*, welche die Herpesviren in Fischen und Amphibien einschließt, den *Malacoherpesviridae* mit dem einzig bekannten Herpesvirus aus Invertebraten und den *Herpesviridae*, welche bis dato über 130 Spezies in Säugetieren, Vögeln und Reptilien umfasst (Davison *et al.*, 2009). Der Name *herpes* stammt vom altgriechischen Wort *herpein* (kriechen), womit der typische von Herpes-simplex-Viren verursachte „kriechende“ bläschenartige Hautausschlag beschrieben wird.

Charakteristisch für alle Herpesviren ist die nahezu identische Morphologie der reifen Viruspartikel, die aus vier strukturellen Komponenten bestehen. Im Kern befindet sich das große doppelsträngige lineare DNA-Genom, welches von einem ikosaedrischen Capsid umschlossen wird. Dieses wiederum ist von einer Proteinmatrix, dem Tegument, umgeben sowie der Virushülle bestehend aus einer Lipidmembran (*envelope*), die den äußeren Abschluss des Partikels bildet. Mit einer Genomgröße zwischen 120 und 250 kb, das je nach Spezies für bis zu 200 Proteine kodiert, und mit einem Viruspartikel von 120 bis 260 nm Durchmesser zählen die Herpesviren zu den größeren Vertretern der Viren. Ebenso teilen alle Mitglieder der *Herpesviridae* biologische Eigenschaften. Die Synthese der viralen DNA sowie der Zusammenbau der Capside erfolgt im Zellkern, alle weiteren Schritte der Morphogenese finden im Cytoplasma statt. Dabei kodieren alle Herpesviren selbst für mehrere Enzyme, die beim Nukleinsäurestoffwechsel, bei der Replikation des Virus-Genoms und der Prozessierung von Proteinen eine Rolle spielen. Eine weitere gemeinsame Eigenschaft aller Herpesviren ist die Fähigkeit, nach der lytischen Primärinfektion, bei welcher die Wirtszellen durch die Produktion und Freisetzung der Viruspartikel absterben, eine lebenslange latente Infektion im Wirt zu etablieren. Während der Latenz liegt das Virus in Form von extra-chromosomalen Episomen mit stabiler Kopienzahl im Kern der Zelle vor, die Expression viraler Proteine ist jedoch meist unterdrückt. Eine Reaktivierung des Virus zum lytischen Infektionszyklus und folglich das Wiederauftreten des typischen Erkrankungsbildes ist jedoch wiederholt möglich (Pellett und Roizman, 2007).

Die Vertreter der *Herpesviridae* werden aufgrund biologischer Eigenschaften wie ihrer Pathogenität, Replikationskinetik und den bevorzugt infizierten Zelltypen sowie durch Analyse der Aminosäuresequenzen in drei Unterfamilien, den α -, β - und γ -Herpesviren, eingeteilt. Die Unterfamilie der α -Herpesviren weist ein breites Wirtsspektrum auf und repliziert effizient mit kurzen Replikationszyklen, wobei es in Zellkultur zu fulminanten zytopathischen Effekten (*cytopathic effect*, CPE) kommen kann. In der latenten Phase

persistieren sie hauptsächlich in sensorischen Ganglienzellen. Die Vertreter der β -Herpesviren haben dagegen ein vergleichsweise enges Wirtsspektrum, einen längeren Vermehrungszyklus und breiten sich *in vitro* langsam mit nur milden CPE aus. Die Latenz kann in verschiedenen Zelltypen etabliert werden, wie z.B. in sekretorischem Drüsen- oder Nierengewebe sowie lymphoretikulärem Gewebe. Die γ -Herpesviren besitzen ebenfalls ein sehr enges Wirtsspektrum, sind jedoch in der Dauer des Replikationszyklus unterschiedlich. Vertreter der γ -Herpesviren infizieren hauptsächlich B- und T-Lymphozyten und liegen in diesen auch während der latenten Phase vor (Pellett und Roizman, 2007).

Bis heute sind insgesamt acht humanpathogene Herpesviren bekannt, die als humane Herpesviren (HHV) bezeichnet und in der Reihenfolge ihrer Entdeckung chronologisch von 1 bis 8 durchnummeriert werden. Zu den α -Herpesviren zählen die Herpes-simplex-Viren Typ 1 und 2 (HSV-1 und -2 bzw. HHV-1 und -2), welche bläschenartigen Ausschlag im Mund- oder Genitalbereich hervorrufen, sowie das Varizella Zoster-Virus (VZV bzw. HHV-3), dem Erreger von Windpocken und Gürtelrose. Das humane Cytomegalovirus (HCMV bzw. HHV-5) und die humanen Herpesviren 6 und 7 (HHV-6, und -7) sind dagegen Vertreter aus der Unterfamilie der β -Herpesviren. HCMV, der Erreger der Cytomegalie, kann bei immunsupprimierten Personen oder während einer Schwangerschaft beim Ungeborenen einen schweren Krankheitsverlauf verursachen. Die symptomatische Infektion mit HHV-6 und vermutlich auch HHV-7 äußert sich meist im Säuglingsalter als sogenanntes Drei-Tage-Fieber. Das Epstein Barr-Virus (EBV bzw. HHV-4) sowie das Karposi-Sarkom assoziierte Herpesvirus (KSHV bzw. HHV-8) gehören zu den γ -Herpesviren und sind an der Entstehung von mehreren humanen Tumoren beteiligt. Eine Primärinfektion mit EBV führt zur infektiösen Mononucleose und ist unter der Bezeichnung Pfeiffersches Drüsenfieber bekannt (Modrow *et al.*, 2010).

2.2. Das Herpes-simplex-Virus 1 (HSV-1)

Das Herpes-simplex-Virus 1 (HSV-1) gehört zu den weltweit häufigsten humanen Krankheitserregern mit einer Seroprävalenz in Deutschland von etwa 85% (Hellenbrand *et al.*, 2005). Die Primärinfektion erfolgt meist in der Kindheit durch Schmierinfektion oder Speichelkontakt und äußert sich hauptsächlich als entzündlicher, bläschenförmiger Hautausschlag an Lippen und Mundschleimhaut. Die Viren werden über die Hautbläschen, welche hohe Konzentrationen an infektiösen viralen Partikeln enthalten, ausgeschieden. Eine Übertragung ist auch durch asymptomatische Träger möglich. Desweiteren kann durch eine HSV-1 Infektion u.a. auch eine Hornhautentzündung (Keratitis) oder in seltenen Fällen eine Gehirnentzündung (Encephalitis) hervorgerufen werden. Während der akuten Infektion gelangen die Viren über Zell-Zell-Kontakt von den Epithelzellen in freie Nervenendigungen, die das infizierte Gewebe versorgen, und von dort durch retrograden axonalen Transport in

die dazugehörigen Trigemini- und Ciliarganglien (Vrabec und Alford, 2004). Dort verbleiben sie lebenslang im latenten Zustand. Bei der Reaktivierung durch endogene oder exogene Faktoren wie z.B. Stress, Immunsuppression, UV-Strahlung oder hormonelle Veränderungen wandern die Viren auf anterogradem Weg entlang der Neuronen zur Hautoberfläche zurück und verursachen dort erneut die gleichen, jedoch meist abgeschwächten Symptome. Eine HSV-1 Infektion kann lokal oder systemisch durch Nucleosid-Analoga wie Aciclovir behandelt werden. Diese werden von der viralen Thymidinkinase UL23 durch Phosphorylierung aktiviert und inhibieren die virale DNA Replikation durch UL30, indem es zum Kettenabbruch kommt. Eine Schutzimpfung gegen HSV-1 Infektionen ist jedoch noch nicht vorhanden (Modrow *et al.*, 2010).

2.2.1. Aufbau des Viruspartikels

Das reife HSV-1 Viruspartikel (Virion) besitzt die für alle Herpesviren typische Morphologie mit einem Durchmesser von 150 bis 200 nm. Vier unterschiedliche Strukturelemente werden aus mehr als 30 verschiedenen viral kodierte Proteinen aufgebaut. Dabei wird der Kern und das Capsid, welche gemeinsam das Nucleocapsid bilden, vom sogenannten Tegument umgeben und schließlich von einer Membranhülle (*envelope*) umschlossen (Abb. 2.1).

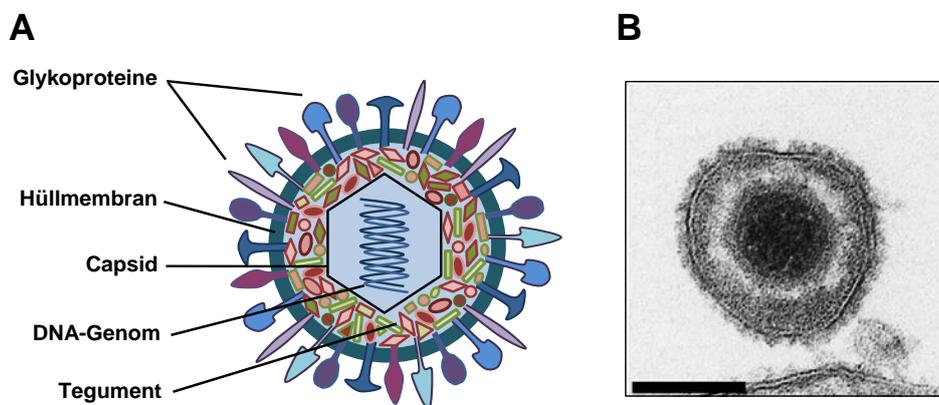


Abbildung 2.1: Aufbau eines Viruspartikels von Herpes-simplex-Virus 1

A) Schematische Übersicht eines HSV-1 Viruspartikels mit seinen charakteristischen Komponenten.
B) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines reifen HSV-1 Virions (schwarzer Balken = 100 nm) (Mettenleiter *et al.*, 2009).

Im Inneren befindet sich der elektronendichte Kern, welcher das virale Genom enthält. Dieses liegt als lineare doppelsträngige, meist spulenartig aufgewickelte DNA vor. Der Kern wird von einem ca. 100 nm großen ikosaedrischen Capsid umgeben, das aus 162 Capsomeren besteht, die in einer T = 16 Symmetrie aus dem Hauptcapsidprotein UL19 (VP5) zusammengesetzt sind. Dabei werden 12 Pentone und 150 Hexone gebildet. Die einzelnen Capsomere werden über Triplexstrukturen aus je einem Molekül UL38 (VP19C) und zwei Molekülen UL18 (VP23) verbunden und stabilisiert. Das kleine Capsidprotein UL35 (VP26) ist mit den Hexonen assoziiert (Roizman *et al.*, 2007). Die Pentone bilden die Ecken

des Ikosaeders, wovon eines einen Kanal, bestehend aus 12 Proteinen des sogenannten Portalproteins UL6, enthält. Durch diesen kann die virale DNA in das neugebildete Capsid eingeschleust werden (Newcomb *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2007). Durch Kryo-Elektronenmikroskopie konnte eine exzentrische Position des Capsids innerhalb des Viruspartikels gezeigt werden (Grunewald *et al.*, 2003).

Zwischen dem Nukleocapsid und der Membranhülle befindet sich das Tegument, eine weitgehend unstrukturierte Proteinmatrix aus etwa 20 verschiedenen Virusproteinen, deren Funktionen zum großen Teil noch ungeklärt sind. Zwei gut charakterisierte Tegumentproteine mit wichtigen regulatorischen Funktionen in der Frühphase der Infektion sind zum einen UL48 (VP16), ein Transaktivator für die *immediate early* Genexpression, und das *virus host shutoff* Protein UL41 (VHS), ein Destabilisator der wirtsspezifischen mRNA (Batterson und Roizman, 1983; Kwong und Frenkel, 1989). Mittels kryo-elektronenmikroskopischer Analysen konnte gezeigt werden, dass sich das Tegument aus zwei Schichten aufbaut. Dabei weist zumindest die innerste, direkt an das Capsid angrenzende Schicht, aufgrund der Interaktion des großen Tegumentproteins UL36 mit dem Hauptcapsidprotein UL19, eine icosaedrische Struktur auf (McNabb und Courtney, 1992; Zhou *et al.*, 1999).

Die äußere Hülle besteht aus einer Lipidmembran, in welcher virale Glykoproteine und mehrere nichtglykosylierte Polypeptide eingelagert sind. Diese erfüllen wichtige Funktionen während der Adsorption des Virions an Rezeptoren auf der Wirts-Zellmembran und der darauffolgenden Aufnahme in die Zelle. Außerdem besitzen sie immun-modulierende Funktionen. Mit Hilfe von Ultrastrukturuntersuchungen und Analysen der biochemischen Zusammensetzung konnte gezeigt werden, dass die Virushülle von zellulären Membranen des Golgi-Netzwerkes abstammt (Granzow *et al.*, 2001; Turcotte *et al.*, 2005). Durch massenspektrometrische Analyse reifer HSV-1 Virionen konnte die Anwesenheit von neun Glykoproteinen (gL, gM, gH, gB, gC, gG, gD, gI und gE) bestätigt werden, ebenso von vier weiteren nichtglykosylierten Virusproteinen (UL20, UL45, UL56 und US9). Das mögliche Vorkommen der Glykoproteine gK, gJ und gN sowie UL43 in reifen Virionen konnte bis jetzt noch nicht eindeutig gezeigt bzw. bestätigt werden (Loret *et al.*, 2008).

2.2.2. Das Genom

Das erste vollständig sequenzierte und publizierte HSV-1 Genom war das des HSV-1 Stamm 17⁺ (McGeoch *et al.*, 1985; McGeoch *et al.*, 1986; McGeoch *et al.*, 1988; Perry und McGeoch, 1988) (GenBank-Nr. NC_001806). Das doppelsträngige lineare Genom besteht aus 152.261 Basenpaaren (bp) und kodiert für mehr als 80 Proteine (Rajcani *et al.*, 2004; Roizman *et al.*, 2007). Es ist aufgeteilt in ein langes (*long*, L) und ein kurzes Segment (*short*, S), wobei man jeweils singulär vorkommende Sequenzbereiche, welche als *unique* (U) bezeichnet werden, und invertierte Abschnitte wiederholter Sequenzen, sogenannte *repeats* (R), unterscheidet (Abb. 2.2). Diese werden je nach ihrer Lage innerhalb des Genoms oder

an den Genomenden als *internal repeat* (IR) oder *terminal repeat* (TR) bezeichnet (Wadsworth *et al.*, 1975). Das L-Segment enthält ca. 126.000 bp, wohingegen das S-Segment nur aus ca. 26.000 bp besteht. Während der Replikation können aufgrund intramolekularer Rekombination der identischen invertierten Sequenzwiederholungen die UL- und US-Segmente unterschiedlich zueinander orientiert sein. Da jedoch das HSV-1 Genom in der Wirtszelle als zirkuläres Episom vorliegt, unterscheiden sich die vier möglichen isomeren Genomformen nicht im Informationsgehalt oder in der Infektiosität der gebildeten Virionen (Jacob *et al.*, 1979). Während des lytischen Infektionszyklus wird die virale DNA nach dem *rolling circle* Mechanismus beginnend von einem der drei Replikationsursprünge (*origin of replication, ori*) repliziert. Diese sind etwa 800 bis 1000 bp lang und palindromisch aufgebaut (Taylor *et al.*, 2002). Dabei lokalisiert *oriL* in der Mitte der UL-Region, *oriS* dagegen in den invertierten Sequenzwiederholungen, welche die US-Region flankieren, weshalb es zweimal im Genom vorhanden ist (Stow, 1982; Gray und Kaerner, 1984). Für eine erfolgreiche Replikation der viralen DNA muss mindestens ein *oriS*-Element vorhanden sein, während der Replikationsursprung *oriL* nicht essentiell zu sein scheint (Roizman *et al.*, 2007).

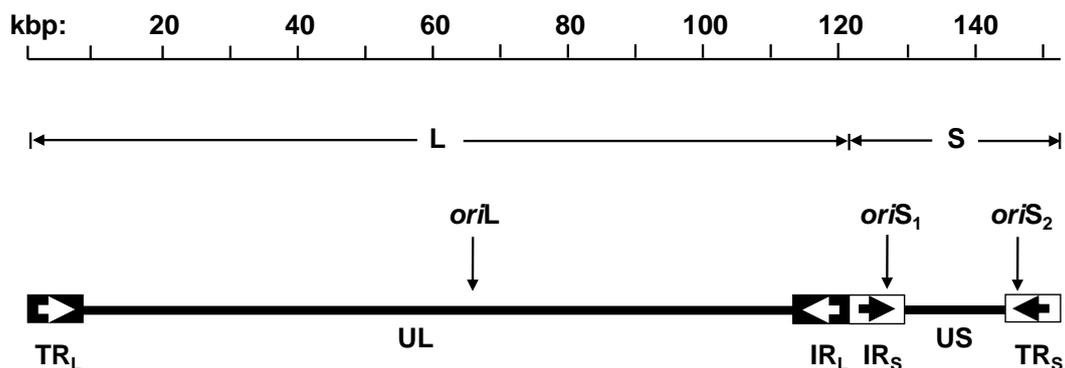


Abbildung 2.2: Genomaufbau des Herpes-simplex-Virus 1

Das ca. 152 kb große HSV-1 Genom ist in ein langes (*unique long*, UL) und ein kurzes Segment *unique short*, US) von singularär vorkommenden Sequenzen unterteilt, die jeweils von Einheiten mit wiederholt vorkommenden Sequenzen (*terminal repeats*, TR; *internal repeats*, IR) flankiert werden. Die drei Replikationsursprünge der lytischen Genomreplikation (*origin of replication, ori*) werden anhand ihrer Lage im Genom als *oriL* bzw. *oriS* bezeichnet.

2.2.3. Die Virusreplikation

Ein Überblick des lytischen Replikationszyklus von HSV-1 basierend auf dem sogenannten *envelopment/de-envelopment/re-envelopment* Modell ist in Abbildung 2.3 dargestellt. Neben diesem werden noch zwei weitere Möglichkeiten postuliert, die jeweils unterschiedliche Auswanderungswege der reifen Virionen aus dem Zellkern vorschlagen (Johnson und Spear, 1982; Leuzinger *et al.*, 2005; Wild *et al.*, 2005). Jedoch wird das hier vorgestellte Modell von zahlreichen molekularbiologischen sowie ultrastrukturellen Analysen gestützt (van Genderen

et al., 1994; Granzow et al., 2001; Skepper et al., 2001; Mettenleiter, 2002; Remillard-Labrosse et al., 2006).

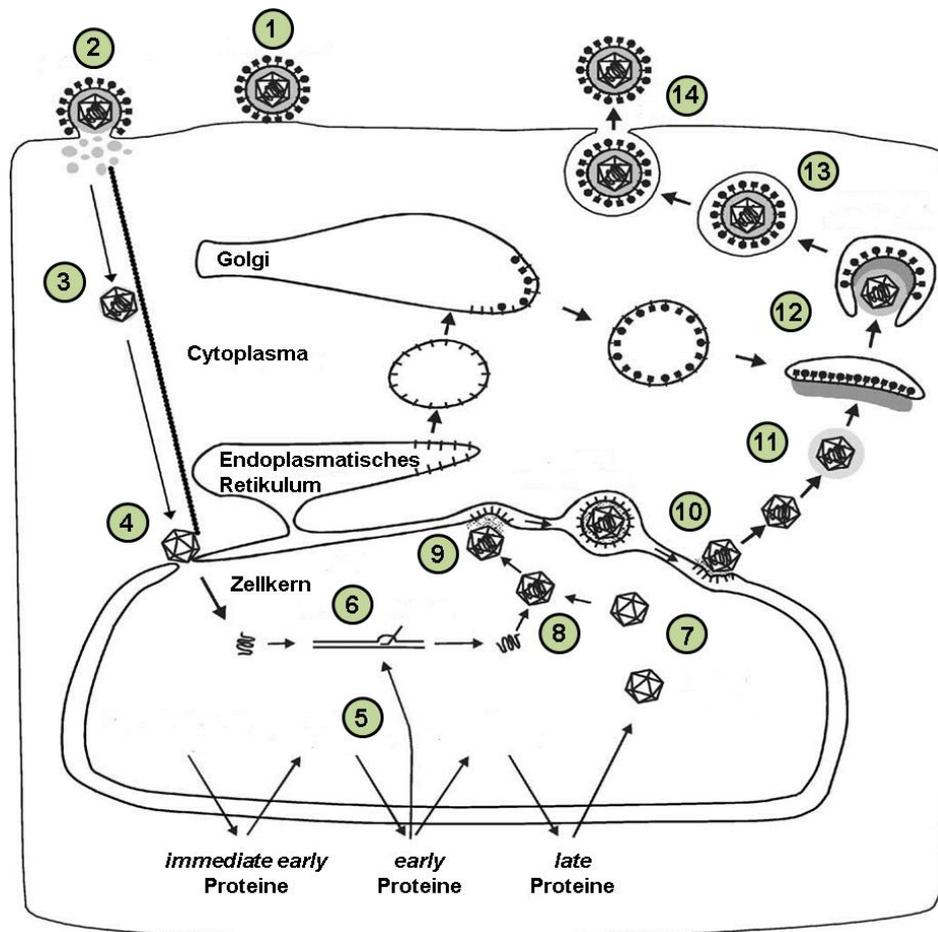


Abbildung 2.3: Schematischer Überblick des Replikationszyklus von HSV-1

Der Eintritt beginnt mit der Adsorption der HSV-1 Virionen an die Zelloberfläche (1) und einer Glykoprotein-vermittelten Fusion mit der Plasmamembran (2). Große Teile des Teguments dissoziieren im Cytoplasma ab. Die Nucleocapside werden entlang von Mikrotubuli zu den Kernporen transportiert (3), wo die virale DNA in den Kern freigesetzt wird (4). Dort beginnt die Transkription (5) und Replikation der viralen DNA (6). Nach autokatalytischem Zusammenbau der Pro-Capside (7), dem Einbau der viralen DNA (8) und Anfügen von ersten Tegumentproteinen gelangen diese durch einen Knospungsprozess an der inneren Kernmembran in den perinukleären Raum (9). Die primär umhüllten Nucleocapside werden nach Fusion mit der äußeren Kernmembran in das Cytoplasma freigegeben (10). Dort kommt es zur Tegumentation (11) und sekundären Umhüllung durch Knospung an modifizierten Golgi-Membranen (12). Die reifen Virionen gelangen in den Transportvesikeln (13) an die Plasmamembran, wo sie durch Membranfusion freigesetzt werden (14) (modifiziert nach Mettenleiter, 2004).

2.2.3.1. Eintritt der Viruspartikel ins Innere der Wirtszelle (entry)

Die HSV-1 Infektion beginnt mit der Adsorption der Virionen an die Zelloberfläche (Abb. 2.3, Schritt 1) durch Interaktion der viralen Glykoproteine gB und/oder gC mit Heparansulfatketten der zellulären Proteoglykane (Spear, 2004). Dieser reversiblen Adsorption folgt die Bindung des Glykoproteins gD an einen der zellulären entry Rezeptoren, von welchen bisher drei verschiedene Klassen bekannt sind. Zu diesen zählt der *Herpesvirus Entry Mediator* (HVEM), einem Vertreter der TNF-Rezeptorfamilie (Tumor-Nekrose-Faktor),

Nectin-1 und -2, die zur Immunglobulin-Superfamilie gehören, und schließlich 3-O-sulfoniertes Heparansulfat (Spear *et al.*, 2000). Durch das Zusammenspiel mit gB und einem Heterodimer aus zwei weiteren Glykoproteinen gH und gL wird die Membranfusion der Virushülle mit der Plasmamembran ausgelöst. Der genaue mechanistische Fusionsablauf ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch geht man davon aus, dass die Bindung von gD an einen der Rezeptoren die virale und zelluläre Membran in räumliche Nähe bringt und zu einer Konformationsänderung von gD führt. Dadurch wird eine Interaktion mit den fusogenen Glykoproteinen gB und gH/gL ermöglicht. Durch Aktivierung des gH/gL-Komplexes erfolgt im nächsten Schritt eine Hemifusion der äußeren Membranen und schließlich die vollständige Fusion, die durch rekrutiertes gB stabilisiert wird (Abb. 2.3, Schritt 2) (Spear und Longnecker, 2003; Subramanian und Geraghty, 2007; Maurer *et al.*, 2008). Anschließend gelangt das virale Nukleocapsid zusammen mit den Tegumentproteinen ins Cytoplasma der Wirtszelle. In einigen Zelltypen konnte auch eine weitere Möglichkeit des Virus-Eintritts durch endozytische Aufnahme der Viruspartikel und pH-abhängige Freisetzung der Capside ins Cytoplasma gezeigt werden (Nicola *et al.*, 2003; Clement *et al.*, 2006).

2.2.3.2. Transport zum Zellkern

Im Cytoplasma werden die Nukleocapside mit Hilfe von zellulären Motorproteinen entlang der Mikrotubuli zu den Kernporen transportiert (Abb. 2.3, Schritt 3) (Sodeik *et al.*, 1997). Die Tegumentproteine dissoziieren zum größten Teil ab, um verschiedene Funktionen im Cytoplasma zu erfüllen oder werden mit dem Capsid bzw. unabhängig davon in den Zellkern eingeschleust. Durch Bindung der Nukleocapside an die Kernporenkomplexe wird das virale Genom über die zelluläre Transportmaschinerie in den Kern freigesetzt (Abb. 2.3, Schritt 4) (Ojala *et al.*, 2000). Die leeren Capside bleiben an der Kernpore zurück (Granzow *et al.*, 1997). Im Kernplasma zirkularisiert das lineare Virus-Genom und liegt dann als Episom vor.

2.2.3.3. Genexpression und Replikation des Virus-Genoms

Nachdem die virale DNA in den Zellkern freigegeben worden ist, beginnt die kaskadenartig regulierte Transkription der viralen Gene (Abb. 2.3, Schritt 5). Diese wird in eine sehr frühe (*immediate early*, α), eine frühe (*early*, β) und späte (*late*, γ) Phase gegliedert. Die *immediate early* Genexpression beginnt, indem der virale Transaktivator UL48, ein Tegumentprotein, welches nach dem Virus-Eintritt ins Cytoplasma abgegeben wird, gemeinsam mit zellulären Transkriptionsfaktoren die Expression der *immediate early* Gene durch die RNA-Polymerase der Wirtszelle aktiviert bzw. verstärkt (Honess und Roizman, 1974; Weir, 2001). HSV-1 kodiert für fünf *immediate early* Proteine (ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 und ICP47), welche als Transkriptionsregulatoren die Expression der *early* Gene kontrollieren. Diese kodieren hauptsächlich für Proteine, welche für die Replikation der Virus-DNA und den Nukleinsäuremetabolismus benötigt werden. Die Transkription der meisten *late* Gene ist abhängig von der

viralen DNA-Replikation, bei ihren Genprodukten handelt es sich vorwiegend um Strukturproteine. Gleichzeitig wird die zelluläre Proteinbiosynthese durch eine virale RNase, kodiert von UL41 (VHS), eingestellt und somit eine ausschließliche Produktion viraler Proteine ermöglicht (Matis und Kudelova, 2001).

Die Replikation des HSV-1 Genoms (Abb. 2.3, Schritt 6) erfolgt zeitgleich mit der Expression der *late* Gene in spezialisierten Kompartimenten innerhalb des Zellkerns (Replikationszentren). Sieben essentielle virale DNA-Replikationsproteine und vermutlich einige zelluläre Proteine werden dafür benötigt. Durch Bindung des *ori* bindenden Proteins UL9 an einen der Replikationsursprünge (*ori*) wird die Virus-DNA entwunden und die Einzelstränge durch UL29 (ICP8) stabilisiert. Nach Anlagerung des Helikase-Primase-Komplexes gebildet aus den Proteinen UL5, UL8 und UL52 sowie der viralen DNA-Polymerase, einem Heterodimer bestehend aus der katalytischen Untereinheit UL30 und dem Prozessivitätsfaktor UL42, beginnt die Neusynthese des viralen Genoms. Diese läuft vermutlich nach dem *rolling circle* Mechanismus ab, wodurch Konkatomere mit mehreren Einheiten des Virus-Genoms entstehen (Boehmer und Lehman, 1997; Lehman und Boehmer, 1999; Taylor und Knipe, 2004).

2.2.3.4. Zusammenbau des Nukleocapsids

Die im Cytoplasma synthetisierten Capsidproteine werden in den Zellkern zurück transportiert, wo der Zusammenbau der Nukleocapside stattfindet (Abb. 2.3, Schritt 7). Zuerst entsteht ein kugelförmiges Vorläufer- bzw. Pro-Capsid. Dazu lagern sich die aus dem Hauptcapsidprotein UL19 gebildeten Hexamere und Pentamere, welche durch UL18/UL38-Triplexstrukturen verbunden werden, um ein Gerüst (*scaffold*) aus UL26 und UL26.5 an, welches mit dem Portalkomplex aus UL6 interagiert. Der nächste Schritt in der Capsidreifung ist der Einbau viraler DNA in das Procapsid (*DNA packaging*) durch den Portalkomplex (Abb. 2.3, Schritt 8). Dabei werden die Gerüstproteine abgebaut. Durch strukturelle Veränderungen sowie der Anlagerung des kleinen Capsidproteins UL35 erlangt das reife Capsid schließlich eine ikosaedrische Form (Booy *et al.*, 1994; Newcomb *et al.*, 1996; Heymann *et al.*, 2003; Newcomb *et al.*, 2003). Neben den Capsidproteinen sind auch die für den *DNA packaging* Prozess benötigten viralen Genprodukte innerhalb der *Herpesviridae* konserviert. Dazu gehören die Untereinheiten der Terminase (UL15, UL28 und UL33), welche die konkatomere DNA an speziellen Erkennungssignalen zu jeweils einer Genomkopie schneidet (*DNA cleavage*), sowie die Proteine UL17, UL25 und UL32 (Lamberti und Weller, 1998; Ogasawara *et al.*, 2001; Sheaffer *et al.*, 2001; Thurlow *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007). Das UL25 Protein wird vermutlich für die Stabilisierung der Capside während der Reifung im Zellkern und auch später für die primäre Umhüllung an der inneren Kernmembran benötigt (Klupp *et al.*, 2006; Kuhn *et al.*, 2008; Cockrell *et al.*, 2009). Die genaue Rolle von UL17 und UL32 beim *DNA cleavage/packaging* Prozess ist hingegen noch weitgehend unklar.

Während der Capsidreifung im Zellkern erfolgt vermutlich auch bereits die Anlagerung von primären Tegumentproteinen, wie z.B. das Capsid-assoziierte Heterodimer gebildet aus den Proteinen UL17 und UL25 (Mettenleiter *et al.*, 2009).

Im Kern von infizierten Zellen liegen drei verschiedene Capsidformen vor, die als A-, B- oder C-Capside bezeichnet werden. C-Capside sind reife Nukleocapside mit eingebauter DNA, B-Capside besitzen noch die Gerüstproteine UL26 und UL26.5, jedoch keine DNA und werden als Vorstufen reifer Capside gesehen. A-Capside hingegen enthalten weder DNA noch Gerüstproteine (Gibson und Roizman, 1972).

2.2.3.5. Primäre Umhüllung und Auswanderung aus dem Zellkern (*nuclear egress*)

Im *envelopment/de-envelopment* Modell erfolgt die Auswanderung der neugebildeten Nukleocapside aus dem Zellkern in zwei Schritten. Zuerst gelangen sie durch einen Knospungsprozess (*budding*) an der inneren Kernmembran (*inner nuclear membrane, INM*) kurzzeitig in den perinukleären Raum (Abb. 2.3, Schritt 9), wodurch primär umhüllte Viruspartikel entstehen (*primary envelopment*). Durch anschließende Fusion der primären Hülle mit der äußeren Kernmembran (*outer nuclear membrane, ONM*) werden die Nukleocapside ins Cytoplasma freigegeben (*de-envelopment*) (Abb. 2.3, Schritt 10). Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Knospungs- bzw. Fusionsprozesses während der Kernausswanderung der neugebildeten Nukleocapside sind in Abbildung 2.4 dargestellt.

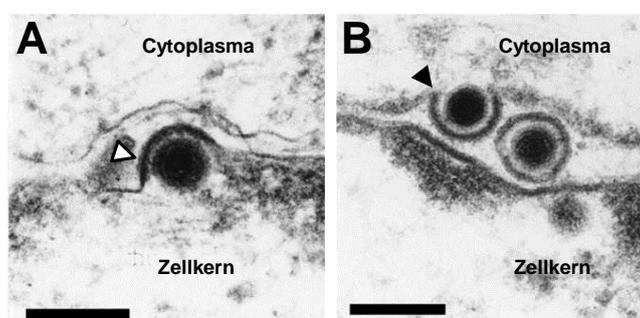


Abbildung 2.4: Knospungs- bzw. Fusionsprozesse während des *nuclear egress*

Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen HSV-1 Nukleocapside während des *nuclear egress* in Vero Zellen (schwarzer Balken entspricht 200 nm). **A)** Im ersten Schritt kommt es zu einem Knospungsprozess an der INM (weißes Dreieck). **B)** Primär umhüllte Nukleocapside im perinukleären Raum gelangen durch Fusion ihrer primären Hülle mit der ONM ins Cytoplasma (schwarzes Dreieck) (Mettenleiter, 2004).

Für den Knospungsprozess an der INM sind die zwei miteinander interagierenden viralen Proteine UL31, ein nukleoplasmatisch lokalisiertes Phosphoprotein, und UL34, ein integrales Typ II-Membranprotein, notwendig. Beide Proteine sind in allen Vertretern der *Herpesviridae* konserviert und essentiell für die Virusreplikation (Chang und Roizman, 1993; Zhu *et al.*, 1999; Farina *et al.*, 2000; Klupp *et al.*, 2000; Roller *et al.*, 2000; Shiba *et al.*, 2000; Reynolds *et al.*, 2001; Dal Monte *et al.*, 2002; Fuchs *et al.*, 2002; Muranyi *et al.*, 2002; Lake und Hutt-

Fletcher, 2004; Gonnella *et al.*, 2005; Schnee *et al.*, 2006; Camozzi *et al.*, 2008; Santarelli *et al.*, 2008), jedoch nur in primär umhüllten Viruspartikeln enthalten (Reynolds *et al.*, 2002; Loret *et al.*, 2008). In Abwesenheit des Partners weist UL31 eine gleichmäßige Verteilung innerhalb des Zellkerns auf, während UL34 in der Kernhülle und zusätzlich in cytoplasmatischen Membranen vorliegt. Zusammen hingegen befinden sich beide Proteine an der INM. Die konservierte Interaktion zwischen UL31 und UL34 wird somit für die Lokalisierung beider Proteine an der INM benötigt, wo sie den sogenannten Kernausswanderungskomplex (*nuclear egress complex*, NEC) bilden (Reynolds *et al.*, 2001; Yamauchi *et al.*, 2001; Fuchs *et al.*, 2002; Muranyi *et al.*, 2002). Über den genauen Wirkmechanismus des NEC ist zwar noch nicht viel bekannt, jedoch konnte kürzlich für das Pseudorabies-Virus gezeigt werden, dass die Coexpression dieser beiden homologen Proteine unabhängig von anderen viralen Faktoren ausreicht, um Vesikel an der INM zu bilden, welche primär umhüllten Partikeln in Morphologie und Größe ähneln (Klupp *et al.*, 2007). Ebenso weisen Mutationsanalysen beider NEC-Proteine darauf hin, dass eine komplexe Interaktion dieser beiden Proteine für die Anlagerung der Capside an der INM und für den darauffolgenden Knospungsprozess benötigt wird. Dabei wird die Krümmung der Membran um die Capside vermutlich durch die Geometrie der Interaktion zwischen UL31 und UL34 und deren mögliche Multimerisierung angetrieben (Roller *et al.*, 2000; Bjerke *et al.*, 2003). Diese Daten sprechen für ein Modell, in welchem UL31 und UL34 eine zentrale Rolle bei der Kernausswanderung übernehmen, während zelluläre und vermutlich auch andere virale Faktoren an diesem mehrstufigen Prozess mitwirken.

Durch die Lokalisation des NEC an der INM erfolgt auch eine Umstrukturierung der Kernhüllen-Architektur durch partielle Auflockerung des Kernlamina-Netzwerks. Dies geschieht wahrscheinlich durch direkte Interaktion von UL31 und/oder UL34 sowie der Rekrutierung von Kinasen, wie z.B. der zellulären Proteinkinase C (PKC) und der viralen Kinase US3, welche durch Phosphorylierung der Kernlamina A/C und B den Zugang der Nukleocapside zur INM ermöglichen (Reynolds *et al.*, 2004; Simpson-Holley *et al.*, 2005; Park und Baines, 2006; Mou *et al.*, 2008). Ebenso werden die integralen INM-Proteine Emerin, welches direkt an Lamina A/C bindet, und der Lamin B-Rezeptor während der Infektion phosphoryliert und verdrängt (Scott und O'Hare, 2001; Morris *et al.*, 2007). Die Proteinkinase US3 ist zwar für die Virusreplikation *per se* nicht essentiell, besitzt aber mehrere zelluläre und virale Substrate, welche an der Kernausswanderung der Nukleocapside beteiligt sind. Wie und ob die dynamische Phosphorylierung durch US3 eine Rolle spielt, ist nach wie vor ungeklärt (Purves *et al.*, 1991; Klupp *et al.*, 2001; Ryckman und Roller, 2004). Es konnte im Gegensatz zu UL31 und UL34 sowohl in primär umhüllten Virionen im perinukleären Raum als auch in reifen extrazellulären Virionen als Teil des Teguments nachgewiesen werden (Reynolds *et al.*, 2002).

Eine effiziente primäre Umhüllung ist ferner gekoppelt mit dem vollständig abgeschlossenen Einbau der viralen DNA in die Nukleocapside. Dafür wird möglicherweise das Capsid-assoziierte Protein UL25 im Komplex mit UL17 benötigt, da in dessen Abwesenheit der Knospungsprozess blockiert ist (Klupp *et al.*, 2006; Trus *et al.*, 2007; Kuhn *et al.*, 2008). Kürzlich konnte für HSV-1 eine Interaktion des NEC-Proteins UL31 mit dem UL17/UL25-Komplex gezeigt werden, welche vermutlich zur effizienten Selektion von DNA-enhaltenden Nukleocapsiden während des primären Umhüllungsschrittes dient (Yang und Baines, 2011). Ebenso weiß man seit Kurzem, dass die homologen UL31 Proteine des Epstein-Barr-Virus (EBV) und des murinen Cytomegalovirus (MCMV) eine zusätzliche Rolle beim *DNA packaging* Prozess spielen (Granato *et al.*, 2008; Popa *et al.*, 2010). Der genaue Mechanismus muss allerdings noch geklärt werden. Desweiteren ist unklar, ob dieser Befund auf HSV-1 UL31 übertragbar ist. In einigen Studien wurden auch zwei virale Glykoproteine, gM und gD, an der INM und in primären Virionen gefunden, was auf eine mögliche Funktion während des Knospungsprozesses hindeutet. Dies wird aber bis jetzt kontrovers diskutiert (Baines *et al.*, 2007; Klupp *et al.*, 2008; Wills *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2011).

Durch den Knospungsprozess an der INM und der anschließenden Membranabtrennung liegen die primär umhüllten Nukleocapside im perinukleären Raum vor. Diese enthalten auch ein primäres Tegument, welches sich jedoch ultrastrukturell deutlich vom finalen Tegument reifer Virionen unterscheidet (Granzow *et al.*, 2001). Nach Fusion ihrer primären Hülle mit der äußeren Kernmembran werden die Nukleocapside in das Cytoplasma freigesetzt, wobei sie ihre primäre Umhüllung (*de-envelopment*) und vermutlich einen Teil der primären Tegumentproteine wieder verlieren. Der genaue Mechanismus ist zwar noch nicht vollständig geklärt, man geht jedoch davon aus, dass US3 eine funktionale Rolle spielt, da in Abwesenheit dieser Kinase eine Anhäufung von primär umhüllten Virionen im perinukleären Raum beobachtet werden konnte (Klupp *et al.*, 2001; Reynolds *et al.*, 2002; Ryckman und Roller, 2004). Ein ähnlicher Phänotyp konnte für eine HSV-1 Mutante, in welcher die Glykoproteine gB und gH gleichzeitig deletiert wurden, gezeigt werden (Farnsworth *et al.*, 2007). Interessanterweise scheint dabei US3 durch Phosphorylierung von gB den Fusionsprozess zu regulieren (Wisner *et al.*, 2009). Auch die Phosphorylierung von UL31, einem weiteren Substrat der US3 Kinase, könnte daran beteiligt sein (Mou *et al.*, 2009).

2.2.3.6. Tegumentation und sekundäre Umhüllung

Nach der Auswanderung der Nukleocapside aus dem Zellkern beginnt im Cytoplasma der Zusammenbau des vollständigen finalen Teguments aus etwa 20 Proteinen, der in mehreren Schritten abläuft (Abb. 2.3, Schritt 11). Man geht davon aus, dass sich zuerst das größte HSV-1 Protein UL36 an das Capsid anlagert und zusammen mit UL37 die innere Tegumentschicht bildet. Über die folgenden Schritte der Tegumentation ist noch wenig bekannt, sie beruhen jedoch auf einem komplexen Netzwerk aus verschiedenen Protein-Protein-

Interaktionen zwischen viralen Capsid-, Tegument- und Glykoproteinen. Die sekundäre und finale Umhüllung der Capside findet durch Knospung der tegumenthaltigen Capside an modifizierten Membranen des Trans-Golgi-Netzwerkes (TGN) statt. In diesen sind bereits die viralen Glykoproteine in glykosylierter Form eingelagert (Abb. 2.3, Schritt 12). Die sekundäre Umhüllung wird vermutlich durch die Wechselwirkung bestimmter Tegumentproteine mit den cytoplasmatischen Domänen viraler Hüllproteine vermittelt (Turcotte *et al.*, 2005; Vittone *et al.*, 2005; Uetz *et al.*, 2006; Sugimoto *et al.*, 2008; Mettenleiter *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2011).

2.2.3.7. Freisetzung reifer Virionen aus der Wirtszelle

Die umhüllten Viruspartikel werden schließlich in Vesikeln zur Plasmamembran der Zelle transportiert (Abb. 2.3, Schritt 13) und dort durch Membranfusion in den extrazellulären Raum freigesetzt (Abb. 2.3, Schritt 14) (Granzow *et al.*, 2001). Es wird vermutet, dass eine Interaktion der Membranproteine gK und UL20 dafür benötigt wird, der genaue Vorgang ist jedoch noch ungeklärt (Baines *et al.*, 1991; Foster *et al.*, 2008). Es werden auch nicht-infektiöse Virionen, sogenannte L- (*Light*) Partikel freigesetzt, die nur aus Tegument und einer Hüllmembran bestehen, jedoch keine Nukleocapside enthalten (McLauchlan und Rixon, 1992).

2.2.3.8. Virusausbreitung mittels Zell-Zell-Kontakt

Für HSV-1 ist auch eine weitere Möglichkeit der Virusausbreitung, der sogenannte *cell-to-cell spread*, bekannt. Bei diesem gelangen Virionen direkt über bestehende Zell-Zell-Kontakte von einer infizierten Zelle in benachbarte uninfizierte Zellen. Dafür wird neben den am Virus-Eintritt beteiligten Glykoproteinen auch ein Komplex aus gE und gI benötigt. Im Verlauf der Infektion wird dieser Komplex über intrazelluläre Sortiersysteme zu Zell-Zell-Verbindungen transportiert. Dort rekrutiert es neugebildete Viruspartikel in den TGN-Vesikeln zu den Verbindungsstellen, von wo der Übertritt zu benachbarten Zellen stattfindet. Durch diesen direkten *cell-to-cell spread* können sich die Viren *in vivo* auch in Anwesenheit von neutralisierenden Antikörpern weiter ausbreiten, ohne von diesen blockiert zu werden (Dingwell und Johnson, 1998; Johnson *et al.*, 2001; Farnsworth und Johnson, 2006).

2.3. Zielsteuerung der NEC-Proteine von HSV-1

In eukaryotischen Zellen findet die DNA-Replikation und -Transkription im Zellkern statt und ist von der anschließenden Synthese der Proteine im Cytoplasma durch die Kernmembran räumlich getrennt. Daher müssen zahlreiche virale Proteine, wie auch die NEC-Proteine, zwischen diesen beiden Kompartimenten spezifisch transportiert werden. Generell geht man davon aus, dass Proteine mit einer Größe von 20-40 kDa die Kernmembran durch Diffusion passieren, während größere Proteine mit Hilfe einer Rezeptor-vermittelten zellulären

Transportmaschinerie aktiv in den Zellkern befördert werden müssen. Das subzelluläre *targeting* der HSV-1 NEC-Proteine UL31 und UL34, d.h. der Mechanismus der Zielsteuerung zur inneren Kernmembran, ist im Hinblick auf diese Arbeit von besonderem Interesse, da eine korrekte subzelluläre Lokalisation für die Funktion beider Proteine und somit auch für den weiteren Replikationsverlauf essentiell ist.

2.3.1. Der Kernauswanderungskomplex (NEC) von HSV-1

Wie bereits in Abschnitt 2.2.3.5 beschrieben, sind für die Auswanderung der Nukleocapside aus dem Zellkern die zwei viralen Genprodukte UL31 und UL34 essentiell, da in Abwesenheit je eines dieser Proteine eine Anhäufung reifer Capside im Zellkern beobachtet werden konnte (Chang *et al.*, 1997; Roller *et al.*, 2000; Reynolds *et al.*, 2001). Gemeinsam werden sie als Kernauswanderungskomplex (NEC) bezeichnet und lokalisieren an der INM. Abbildung 2.5 zeigt eine schematische Darstellung der NEC-Proteine von HSV-1.

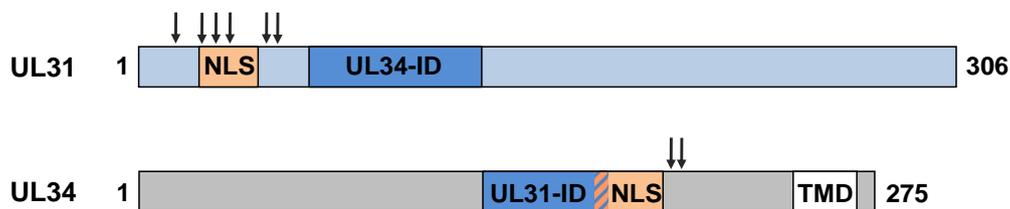


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der NEC-Proteine von HSV-1

Das HSV-1 Protein UL31 besteht aus 306 Aminosäuren (As.) und besitzt in einer konservierten Region (As. 60-127) eine UL34-Interaktionsdomäne (UL34-ID) sowie eine potentielle NLS Sequenz im variablen N-terminalen Bereich (As. 21-42). UL34 ist ein 275 As langes *tail anchor* Protein mit einer C-terminalen Transmembrandomäne (As. 253-272) sowie einer UL31-interagierenden Region (As. 137-181) und einer vorhergesagten NLS Sequenz (As. 177-195) innerhalb der N-terminalen Domäne. Phosphorylierungsstellen für die virale Proteinkinase US3 sind jeweils durch Pfeile gekennzeichnet.

Das Genprodukt von UL31 ist ein 34 kDa großes basisches Phosphoprotein, welches aus 306 Aminosäuren (As.) besteht (Chang und Roizman, 1993). Ursprünglich ging man davon aus, dass UL31 erst spät im Infektionsverlauf als ein *late* Protein synthetisiert wird (Holland *et al.*, 1984). Kürzlich konnte aber gezeigt werden, dass UL31 von HSV-1 in geringen Mengen auch bereits in der frühen Phase der Infektion nach etwa 2 Stunden exprimiert wird, was für eine optimale NFκB-Aktivierung sowie virale Genexpression notwendig ist (Roberts und Baines, 2011). Das UL31 Protein setzt sich aus einem hydrophilen variablen amino- (N-) terminalen und einem eher hydrophoben konservierten carboxy- (C-) terminalen Bereich zusammen. Die N-terminale Region erstreckt sich etwa von As. 1 bis 100 und weist kaum Homologien zu den anderen Herpesvirus-Unterfamilien auf. Diese enthält sechs Phosphorylierungsstellen der Proteinkinase US3, die aber für die Virusreplikation nicht von großer Bedeutung sind (Mou *et al.*, 2009). Jedoch konnte durch Deletionsanalysen der N-terminalen Domäne von UL31-Orthologen in HSV-2 und MCMV gezeigt werden, dass diese ein Kernlokalisierungssignal (*nuclear localisation signal*, NLS) enthält, welches essentiell für

die nukleäre Lokalisation (Zhu *et al.*, 1999; Yamauchi *et al.*, 2001) sowie Funktion des Proteins ist (Lotzerich *et al.*, 2006). Für HSV-1 wurde bis jetzt noch nicht genau untersucht, ob UL31 ebenfalls einem aktiven Kernimport folgt, aber mit Hilfe von bioinformatischen Methoden konnte eine klassische NLS Sequenz innerhalb der variablen Region zwischen As. 21 bis 42 vorhergesagt werden, welche konserviert in den anderen herpesviralen Orthologen vorliegt. Die C-terminale Domäne besteht aus 4 konservierten Regionen (*conserved region*, CR), wobei durch eine Protein-Komplementationsstudie eine UL34-Interaktionsregion im CR1-Bereich, der von As. 60 bis 127 reicht, identifiziert werden konnte (Schnee *et al.*, 2006). Zusätzlich konnte bei MCMV ein weiterer essentieller Bereich für den Capsidexport aus dem Zellkern und für den *DNA packaging* Prozess nahe dem C-Terminus in der CR4-Region identifiziert werden (Popa *et al.*, 2010). Eine Beteiligung an diesem Prozess während der Capsidreifung konnte auch bereits für das UL31 orthologe Protein aus EBV gezeigt werden (Granato *et al.*, 2008).

Das Genprodukt von UL34 ist ein 30 kDa großes Typ II-Transmembranprotein, das aus 275 Aminosäuren besteht und als *late* Protein erst in der späten Phase der Infektion gebildet wird. UL34 ist aus zwei Domänen aufgebaut. Die N-terminale Domäne reicht von As. 1 bis 252 und ragt ins Cyto- und/oder Nukleoplasma, während die C-terminale Domäne die As. 253 bis 275 umfasst und einen 20 As. langen hydrophoben Transmembranbereich gefolgt von einer kurzen luminalen Domäne enthält. Gekennzeichnet durch eine einzige Transmembrandomäne (TMD) und deren Lage am äußersten C-terminalen Ende wird UL34 als ein sogenanntes *tail anchor* (TA) Protein eingestuft (Shiba *et al.*, 2000; Bjerke *et al.*, 2003). In der N-terminalen Region liegt zum einen im Bereich von As. 137 bis 181 die UL31-Bindedomäne sowie Phosphorylierungsstellen für US3 (Purves *et al.*, 1991; Liang und Baines, 2005). Ebenso konnte wie für UL31 mittels bioinformatischer Berechnungen eine klassische NLS Sequenz zwischen As. 177 und 195 identifiziert werden. Kürzlich konnte durch Komplementationsstudien von UL34 Mutanten mit Mutationen innerhalb verschiedener geladener Cluster gezeigt werden, dass UL34 außer der UL31-Interaktionsdomäne und der Membranverankerung noch einen weiteren funktional essentiellen Bereich enthalten muss. Vermutlich gibt es noch eine zweite durch Konformationsänderung hervorgerufene Interaktion zwischen einem N-terminalen Sequenzbereich von UL34 und einem C-terminalen Bereich von UL31, welche für die Ausbildung der Membrankrümmung um die Capside an der INM mitverantwortlich sein könnte (Roller *et al.*, 2010).

2.3.2. Der klassische Kernimport von Proteinen

Der Zellkern ist vom Cytoplasma durch eine Kernhülle abgetrennt, welche aus einer inneren und einer äußeren Kernmembran besteht und durch den perinukleären Raum getrennt wird. Desweiteren ist die äußere Kernmembran kontinuierlich mit der des Endoplasmatischen Retikulums (ER) verbunden, während die innere Kernmembran auf der nukleären Seite von

einer Kernlamina ausgekleidet wird. In dieser Kernhülle sind sogenannte Kernporenkomplexe (*nuclear pore complex*, NPC) eingebettet, welche die einzige bekannte Möglichkeit für den bidirektionalen Austausch von Molekülen zwischen Cytoplasma und Nukleus darstellen (Vasu und Forbes, 2001). Der NPC ist ein großer Multiproteinkomplex mit einem Molekulargewicht von etwa 125 Millionen Dalton, der aus drei strukturellen Untereinheiten aufgebaut ist (Fahrenkrog *et al.*, 2001). Durch proteomische Analysen konnte gezeigt werden, dass der NPC aus etwa 30 verschiedenen Proteinen besteht, den sogenannten Nukleoporinen, die in einer achtfachen Rotationssymmetrie entlang des Porenkanals und auf der cytoplasmatischen sowie nukleären Seite angeordnet sind (Rout und Aitchison, 2000; Cronshaw *et al.*, 2002). Ein charakteristisches Merkmal für viele Nukleoporine ist das Vorhandensein von verschiedenen Phenylalanin- (F) und Glyzin- (G) reichen Wiederholungssequenzen (*FG repeats*), welche eine funktional wichtige Rolle für den Transport von Molekülen spielen (Bayliss *et al.*, 2000; Bayliss *et al.*, 2002). Aufgrund der Größe des Porenkanals können Ionen und kleine Proteine unter 20-40 kDa diesen durch Diffusion passieren, während größere Moleküle durch einen aktiven Rezeptor-vermittelten Transport befördert werden müssen (Gorlich und Kutay, 1999).

Der aktive nukleo-cytoplasmatische Transport ist ein Signal- und Energie-abhängiger Prozess und wird von spezifischen Transportrezeptoren vermittelt, welche überwiegend zur Importin β -Familie gehören und je nach Funktion als Importine, Exportine oder Transportine bezeichnet werden. Es existieren mehrere Importwege für Proteine in den Zellkern, aber im Allgemeinen erkennen die Importin β -Transportrezeptoren das zu transportierende Protein (Cargoprotein) über spezifische Signalsequenzen, den Kernlokalisierungssignalen (*nuclear localisation signal*, NLS), und interagieren mit diesen direkt oder durch Adaptorproteine (Fried und Kutay, 2003). Zuerst wurden zwei Typen von Kernlokalisierungssignalen beschrieben, deren Konsensus-Sequenzen in vielen Kernproteinen enthalten sind und als klassische NLS (*classical NLS*, cNLS) bezeichnet werden (Tab. 2.1).

2.1: Klassische Kernlokalisierungssignale (cNLS)

Modell-Protein	Transportsignal	Sequenz	Konsensus-Sequenz
SV40 T-Antigen	monopartite cNLS	<u>PKKKRKV</u>	K(K/R)X(K/R)
Nucleoplasmin	bipartite cNLS	<u>KRPAATKKAGQAKKKKL</u>	(K/R)(K/R)X ₁₀₋₁₂ (K/R) _{3/5}

Die Aminosäure- (As.) Sequenz ist im Einbuchstabencode angegeben, wobei X für jede beliebige As. steht. (K/R)_{3/5} = mindestens 3 von 5 aufeinanderfolgende As. sind basisch (Lysin oder Arginin)

Diese bestehen entweder aus einem oder aus zwei kurzen Abschnitten von basischen Aminosäuren (monopartite bzw. bipartite cNLS). Eine monopartite cNLS, die zuerst im großen Tumor-Antigen vom Simian Virus 40 (SV40) gefunden wurde, besteht aus einem Cluster von 4-5 basischen Aminosäuren, während eine bipartite cNLS, die erstmals für das Nucleoplasmin beschrieben wurde, eine zweite basische Region enthält, die sich 10-12

Aminosäuren nach dem ersten basischen Cluster befindet (Kalderon *et al.*, 1984; Robbins *et al.*, 1991). Cargoproteine, die diese klassischen Signale tragen, werden vom Transport-Adaptorprotein Importin α in Assoziation mit Importin β erkannt und gebunden (Gorlich *et al.*, 1996). Nach Bildung des trimeren Import-Komplexes erfolgt die durch Importin β -vermittelte Translokation durch den NPC in den Zellkern. Der genaue Mechanismus für die Bewegung durch die Kernpore ist dabei noch nicht vollständig geklärt und wird kontrovers in verschiedenen Modellen diskutiert. Man geht jedoch davon aus, dass transiente Interaktionen zwischen Importin β mit den *FG repeats* der Nukleopore eine wichtige Rolle dabei spielen (Fried und Kutay, 2003). Im Nukleoplasma erfolgt nun die Dissoziation des Komplexes durch die Interaktion von Importin β mit der kleinen GTPase Ran, welche im Zellkern konzentriert in der GTP-gebundenen Form (RanGTP) vorliegt. Aufgrund einer Konformationsänderung dissoziiert zuerst Importin β und schließlich Importin α vom Import-Komplex ab, wodurch das Cargoprotein freigesetzt wird (Rexach und Blobel, 1995, Kobe, 1999 #1622; Lee *et al.*, 2005). Die Beteiligung eines ausschließlich nukleär lokalisierten Nukleoporins an diesem Dissoziationsprozess konnte ebenso gezeigt werden (Matsuura und Stewart, 2005). Um den Importzyklus aufrecht zu erhalten, müssen die Importine zuletzt wieder ins Cytoplasma zurückgeführt werden. Importin β wird dabei im Komplex mit RanGTP, während Importin α gemeinsam mit dem spezifischen Exportfaktor CAS, einem weiteren Mitglied der Importin β -Familie, und RanGTP aus dem Zellkern transportiert wird (Kutay *et al.*, 1997). Im Cytoplasma stimuliert das Protein RanGAP (*Ran GTPase activating protein*) gemeinsam mit dem akzessorischen Protein RanBP1 (*Ran binding protein 1*), welches RanGTP von den Transportrezeptoren entfernt, die GTPase-Aktivität von Ran. Dies führt zur Hydrolyse des Ran gebundenen GTP zu GDP und zur Freisetzung der Importfaktoren, die schließlich einen neuen Import-Komplex bilden können (Abb. 2.6 A) (Bischoff *et al.*, 1994; Bischoff und Gorlich, 1997). Damit die nukleo-cytoplasmatische Aufteilung von Ran aufrechterhalten bleibt, muss auch Ran zwischen Zellkern und Cytoplasma zirkulieren. Dafür sorgt der spezifische nukleäre Transportfaktor 2 (NTF2), welcher cytoplasmatisches RanGDP bindet und wieder in den Zellkern zurück transportiert (Ribbeck *et al.*, 1998). Dort vermittelt das Chromatin-assoziierte Protein RanGEF (*RanGTP exchange factor*) den Austausch von Ran-gebundenem GDP gegen GTP (Abb. 2.6 B) (Klebe *et al.*, 1995). Somit liegt Ran im Cytoplasma ausschließlich in GDP-gebundener Form vor (RanGDP), während es im Zellkern konzentriert in GTP-gebundener Form vorkommt (RanGTP). Auf diese Weise werden Importsubstrate aktiv gegen einen chemischen Gradienten im Kerninneren akkumuliert, wobei die benötigte Energie aus dem beschriebenen Ran-Nukleotid-Gradienten gewonnen wird. Auch die Direktionalität des Transports wird über diesen nukleo-cytoplasmatischen Gradienten von Ran gesteuert, so dass Ran eine wichtige regulatorische Schlüsselfunktion im Transportprozess zukommt

(Izaurrealde *et al.*, 1997). Dabei regulieren mehrere bereits genannte Proteine den Nukleotid-gebundenen Zustand von Ran, die entweder im Kern oder im Cytoplasma zu finden sind.

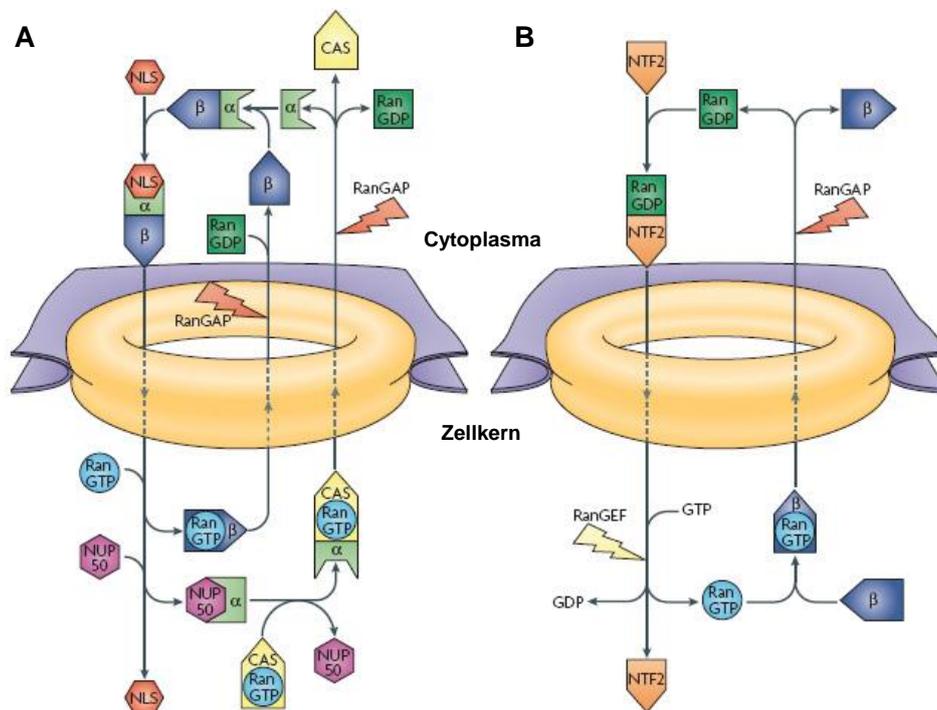


Abbildung 2.6: Schematischer Überblick des klassischen Kern-Imports von Proteinen

A) Im Cytoplasma werden Importsubstrate mit einer NLS durch das Heterodimer aus Importin α und Importin β gebunden. Nach Translokation des trimeren Import-Komplexes durch die Kernpore bindet RanGTP im Nukleus an Importin β , wodurch der Komplex zerfällt und das Importsubstrat unter Beteiligung des Nukleoporins NUP50 schließlich freigesetzt wird. Die Importine werden anschließend zurück ins Cytoplasma geführt, wobei Importin β im Komplex mit RanGTP und Importin α durch seinen Exportfaktor CAS und RanGTP transportiert wird. Im Cytoplasma stimuliert RanGAP die GTP-Hydrolyse, wobei die Importine entlassen werden und für einen neuen Importzyklus zur Verfügung stehen. **B)** Um den Ran-Gradienten aufrechtzuerhalten, zirkuliert Ran zwischen Cytoplasma und Zellkern. Dafür wird cytoplasmatisches RanGDP in den Kern durch den Kern-Transportfaktor NTF2 befördert, wo RanGEF den Nukleotid-Austausch von Ran gebundenem GDP gegen GTP katalysiert. Durch Bindung der Transportfaktoren wird RanGTP wieder ins Cytoplasma exportiert, wo RanGAP die GTP-Hydrolyse stimuliert. Dieser Kreislauf ist daher mit Veränderungen im Nukleotid-gebundenen Zustand von Ran assoziiert (Stewart, 2007).

Der klassische Kernimport von Proteinen ist der am besten charakterisierte Transportweg, da alle beteiligten Komponenten bereits identifiziert werden konnten und auch strukturelle Informationen vorhanden sind. Die Konsensus-Sequenzen der beiden klassischen Kernlokalisierungssignale (cNLS) werden dabei oft als prototypische NLS angesehen, so dass durch eine Reihe von bioinformatischen Studien eine Vielzahl von Proteinen mit einem möglichen cNLS Motiv vorhergesagt werden konnten. Damit eine putative cNLS aber als eine funktionale *targeting* Sequenz angesehen werden kann, muss sie mehrere Kriterien erfüllen. Erstens muss gezeigt werden, dass die Sequenz essentiell für den Import ist, d.h. der Transport des Proteins in den Zellkern wird durch Deletion oder Mutation der Sequenz dramatisch beeinträchtigt. Ebenso muss der Transfer der putativen NLS auf ein inertes

Protein möglich sein und ausreichen, damit dieses in den Zellkern transportiert wird. Und zuletzt muss gezeigt werden, dass das zu untersuchende Protein direkt über die identifizierte Sequenz mit den möglichen Import-Rezeptoren interagiert (Lange *et al.*, 2007).

Ursprünglich wurde dieser NLS-abhängige aktive Importweg für lösliche Proteine beschrieben, jedoch geht man mittlerweile davon aus, dass auch integrale Proteine der INM auf diesem Weg transportiert werden können, da in vielen Proteinen der INM, wie z.B. dem Lamin B-Rezeptor, LAP1, LAP2 β und Emerin, bereits NLS-ähnliche Signalsequenzen identifiziert werden konnten. Vermutlich inserieren diese zunächst in die ER-Membran bzw. äußere Kernmembran, von wo sie anschließend passiv oder mit Hilfe des Importin α /Importin β -Rezeptorkomplexes durch den peripheren NPC zur INM gelangen. Dort werden sie durch direkte oder indirekte Interaktion mit der Kernlamina und/oder dem Chromatin an der INM festgehalten. Auf welchem Weg ein integrales Protein die INM erreicht, hängt anscheinend vor allem von der Größe der extra-luminalen Domäne ab. Proteine mit einer kleinen extra-luminalen Domäne (<~25 kDa) können passiv zwischen der inneren und äußeren Kernmembran sowie dem ER diffundieren, während der Transport von Proteinen mit größerer extra-luminaler Domäne (>~25 kDa) aktiv durch einen Rezeptor-vermittelten Import unterstützt werden muss. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Importin α -Isoform (Importin α -16) sowie Komponenten des NPC (NUP50 und NUP170) an der Erkennung und am Transport von INM-Proteinen beteiligt sind (Lusk *et al.*, 2007). Die Größe der NEC-Proteine UL31 und UL34 liegt jeweils im Grenzbereich, der eine passive Diffusion noch ermöglichen würde. Da jedoch für beide eine klassische NLS vorhergesagt wird, wäre es auch denkbar, dass sie auf dem eben beschriebenen aktiven Importweg an die INM gelangen.

2.3.3. Die Biogenese von *tail anchor* Proteinen

HSV-1 kodiert für 18-19 Transmembranproteine, wobei UL34 und noch zwei weitere Proteine (UL56 und US9) zu der *tail anchor* (TA) Proteinfamilie gehören. Diese unterscheiden sich von anderen Transmembranproteinen in ihrer Biogenese, d.h. im Insertionsmechanismus und in der Zielsteuerung zur Membran. Eine nähere Betrachtung der Biogenese von TA-Proteinen vor allem in Bezug auf die korrekte Zielsteuerung von UL34 sowie die Auswirkung auf die HSV-1 Infektion im Allgemeinen soll somit ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit sein.

TA-Proteine bilden eine besondere Gruppe innerhalb der Typ II-Transmembranproteine mit mehr als 400 Vertretern, die in unterschiedlichen Membransystemen innerhalb der eukaryotischen Zelle gefunden werden (Kalbfleisch *et al.*, 2007). Dort übernehmen sie in verschiedenen fundamentalen zellulären Prozessen eine wichtige Rolle, wie z.B. die Proteine der Bcl-2 Familie bei der Regulation der Apoptose, viele der SNARE Proteine beim vesikulären Transport und der Vesikelfusion, sowie beim Protein-Abbau und der Protein-

Translokation (Cory und Adams, 2002; Borgese *et al.*, 2003; Jahn und Scheller, 2006). Charakteristisch für TA-Proteine ist eine einzelne Transmembrandomäne (TMD) am C-terminalen Ende, wobei ihre funktionale N-terminale Region cytoplasmatisch und ein kurzer polarer C-terminaler Sequenzbereich luminal orientiert vorliegen (Kutay *et al.*, 1993). Den TA-Proteinen fehlt eine N-terminale Signalsequenz, so dass ihre Transmembranregion neben der Membranverankerung auch die einzige *targeting* Sequenz für Membraninsertion darstellt. Aufgrund der Nähe der TMD zum C-terminalen Ende wird diese jedoch erst nach Beendigung der Translation vom Ribosom für cytosolische Faktoren zugänglich. Daher können TA-Proteine, im Gegensatz zu allen anderen Transmembranproteinen, nicht co-translational mit SRP (*signal recognition particle*) interagieren, sondern müssen auf einem post-translationalen Weg in ihre Zielmembranen inseriert werden. Somit können sie aber auch direkt in andere Membransysteme als das ER eingebaut werden, wie z.B. in die äußere Mitochondrien- oder Peroxisomenmembran (Cross *et al.*, 2009; Borgese und Fasana, 2011). Aus zahlreichen *in vitro* Studien geht hervor, dass der *tail anchor* und die flankierenden Sequenzen selbst das subzelluläre *targeting* Signal von TA-Proteinen darstellt, d.h. TA-Proteine werden abhängig von der Länge und Hydrophobizität ihrer TMD sowie den flankierenden geladenen Bereichen in ihre jeweilige Zielmembranen inseriert. Dabei weisen TA-Proteine der äußeren Mitochondrienmembran eine eher kurze TMD mit moderater Hydrophobizität auf, die normalerweise auf einer oder beiden Seiten von positiv geladenen Aminosäuren flankiert werden, während die ER-lokaliserten TA-Proteine Unterschiede in der Länge und Hydrophobizität der TMD sowie den angrenzenden geladenen Bereichen besitzen können (Nguyen *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1999; Kaufmann *et al.*, 2003; Rapaport, 2003). Das ER scheint jedoch für den größten Teil der TA-Proteine die bevorzugte Zielmembran zur Insertion zu sein, von welcher sie anschließend in verschiedene sekretorische Kompartimente der Zelle, wie z.B. zum Golgi, zu den Endosomen und Lysosomen sowie zur Kernhülle oder zur Plasmamembran durch vesikulären Transport exportiert werden können (Rabu *et al.*, 2009). Damit die TA-Proteine während der Zielsteuerung zur ER in einer Membraninsertions-kompetenten Konformation erhalten bleiben, werden Chaperone benötigt, welche eine Aggregation der hydrophoben Sequenzen der TMD im Cytoplasma verhindern. Durch *in vitro* Studien wurde gezeigt, dass mehrere konkurrierende Chaperon-Systeme für die Zielsteuerung von TA-Proteinen zum ER und für die Membraninsertion existieren, wofür Energie in Form von Nukleotid-Triphosphaten benötigt wird. Ebenso sind spezifische Membranproteine beteiligt, durch welche die Integration ins ER ermöglicht bzw. erleichtert wird (Abell *et al.*, 2007; Colombo *et al.*, 2009). Lediglich für das TA-Protein Cytochrome b5, dessen TMD eine geringe Hydrophobizität aufweist, konnte eine spontane Energie-unabhängige Membraninsertion ohne Beteiligung von cytosolischen Chaperonen oder Membranrezeptoren gezeigt werden (Brambillasca *et al.*, 2006; Colombo *et al.*, 2009).

Für die Biogenese der meisten TA-Proteine wurden bis jetzt drei Chaperon-vermittelte Wege beschrieben. Zum einen kann sie durch SRP in einer ungewöhnlichen post-translationalen Rolle vermittelt werden, andererseits durch das Hsc70/Hsp40-Dimer, zweier Mitglieder aus der Familie der Hitzeschockproteine. Kürzlich wurde die ATPase Asna1 entdeckt, welche die erste identifizierte 40 kDa Untereinheit des sogenannten *transmembrane domain recognition complex* (TRC) ist und auch als TRC40 bezeichnet wird. Mehrere Befunde deuten darauf hin, dass Asna1/TRC40 ein Bestandteil des wichtigsten Insertionswegs für ER-lokalisierte TA-Proteine darstellt (Stefanovic und Hegde, 2007; Rabu *et al.*, 2009; Borgese und Fasana, 2011).

2.4. Bedeutung von NEC-interagierenden Wirtsfaktoren für die herpesvirale Replikation

Eine HSV-1 Infektion hat in der Wirtszelle verschiedenste drastische Veränderungen zur Folge, da diese durch das Virus so umprogrammiert wird, dass die herpesvirale Replikation optimal ablaufen kann (Roizman *et al.*, 2007). Um in zelluläre Prozesse modulierend eingreifen zu können, sind aber zusätzlich zu den intraviralen Protein-Protein-Interaktionen auch Wechselwirkungen mit Wirtsproteinen dringend erforderlich. Die Charakterisierung des komplexen Interaktionsnetzwerkes von Virus und Wirt ist daher für ein besseres mechanistisches Verständnis des herpesviralen Lebenszyklus und auch für die Entwicklung von neuen antiviralen Therapien von großer Bedeutung. Einer der essentiellen Schritte in der Virus-Morphogenese ist die Auswanderung von neugebildeten Capsiden aus dem Zellkern durch eine Abfolge von Knospungs- sowie Fusionsprozessen an der Kernmembran. Wie bereits erwähnt, spielen dabei vor allem die viralen NEC-Proteine UL34 und UL31 und vermutlich auch mehrere zelluläre Proteine eine entscheidende Rolle. Jedoch ist bis jetzt erst wenig über den Einfluss von potentiellen Wirtsfaktoren auf den *nuclear egress* bekannt. Ein in Bezug auf die Biogenese und die Zielsteuerung des HSV-1 TA-Proteins UL34 interessanter Kandidat ist das Wirtsprotein Asna1, welches als ein wichtiger *Targeting*- und Insertionsfaktor für TA-Proteine gehandelt wird. Durch einen genomweiten Y2H *screen*, in welchem 107 HSV-1 cDNA Konstrukte auf Interaktion gegen die humane Genbank *MGC* (*Mammalian Gene Collection*) (Lamesch *et al.*, 2007) getestet wurden, konnte ein weiteres, mit den NEC-Proteinen interagierendes Wirtsprotein, die Phospholipid Scramblase 1 (PLSCR1), identifiziert werden. Mit einer gleichzeitig durchgeführten genomweiten Analyse basierend auf RNA Interferenz konnte außerdem bereits gezeigt werden, dass dieses zelluläre Protein auch einen Einfluss auf die HSV-1 Replikation ausübt (J. Haas, unpublizierte Daten). Diese beiden Wirtsfaktoren stellen somit mögliche zelluläre Regulatoren des NEC bzw. *nuclear egress* dar und wurden deshalb in die funktionale Analyse des HSV-1 NEC miteinbezogen.

2.4.1. Der Asna1/TRC40-vermittelte Insertionsweg für TA-Proteine

Asna1/TRC40 ist eine cytosolische ATPase und wurde ursprünglich als homologes Protein der prokaryotischen ATPase ArsA, die für die Arsenit-Resistenz in Bakterien verantwortlich ist, gefunden (Chen *et al.*, 1986; Leipe *et al.*, 2002). In Eukaryoten konnte jedoch keine Arsenit-stimulierte ATPase-Aktivität nachgewiesen werden, weshalb dem Protein eine noch unbekannte Funktion zugeschrieben wurde (Kurdi-Haidar *et al.*, 1998). Biochemische Experimente führten schließlich zu der Entdeckung, dass Asna1/TRC40 als Chaperon spezifisch an die TMD von TA-Proteinen bindet und dadurch eine wichtige Rolle bei deren Biogenese spielt. Während den letzten Jahren lag der Fokus von zahlreichen Studien in der mechanistischen Untersuchung dieses neuen ATP-abhängigen Chaperons. Hauptsächlich wurde dabei im Hefesystem mit dem Asna1-homologen Protein Get3 gearbeitet. Kürzlich wurden durch mehrere Kristallstrukturen von Get3 erste Erkenntnisse über den molekularen Mechanismus gewonnen, mit welchem TA-Proteine während der Zielsteuerung zur Membran von Get3 bzw. Asna1/TRC40 gebunden sowie wieder freigesetzt werden. Ebenso bieten diese Strukturen erste Modelle an, wie ATP-Bindung und -Hydrolyse diese Schritte regulieren könnten, was jedoch derzeit noch kontrovers diskutiert wird (Bozkurt *et al.*, 2009; Mateja *et al.*, 2009; Suloway *et al.*, 2009). Mit allen Studien konnte aber gezeigt werden, dass Get3 ein Homodimer bildet, wobei jedes Monomer, das aus einer ATPase Domäne sowie einer α -helikalen Domäne besteht, in zwei Konformationen vorliegen kann. In Abwesenheit eines Nukleotids weist Get3 eine offene Dimer-Architektur auf, wohingegen durch Bindung eines Nukleotids das Get3-Dimer in eine geschlossene Konformation wechselt. Dabei wird eine hydrophobe Furche gebildet, die sehr wahrscheinlich die Bindestelle für TA-Proteine darstellt (Abb. 2.7 A). Parallel konnten durch genetische und physische *in vitro* Interaktionsstudien weitere Komponenten des Get-Komplexes identifiziert werden, die mit Get3 interagieren und gemeinsam die Translokation der TA-Proteine zur ER-Membran bewirken (Abb. 2.7 B). Man geht davon aus, dass ein Komplex aus Get4, Get5 und dem Protein Sgt2 den TRC bilden. Dieser liegt vermutlich assoziiert am Ribosom vor, wodurch neu synthetisierte TA-Proteine direkt nach der Freisetzung ins Cytoplasma abgefangen werden könnten (Fleischer *et al.*, 2006). Im Chaperon-Komplex wird das TA-Protein zu Get3 rekrutiert, auf welches das TA-Protein übertragen wird. Get3 liegt hierbei in einer geschlossenen Dimer-Konformation vor. Schließlich bindet Get3 an einen ER-Rezeptor, gebildet aus Get1 und Get2, und nimmt dabei, ausgelöst durch ATP-Hydrolyse, eine offene Dimer-Struktur an, wodurch Get3 vom Rezeptor dissoziiert und das TA-Protein für die Insertion in das ER freigelassen wird. Wie die Translokation in die Phospholipid-Doppelschicht abläuft, ist noch unklar (Schuldiner *et al.*, 2008; Jonikas *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010).

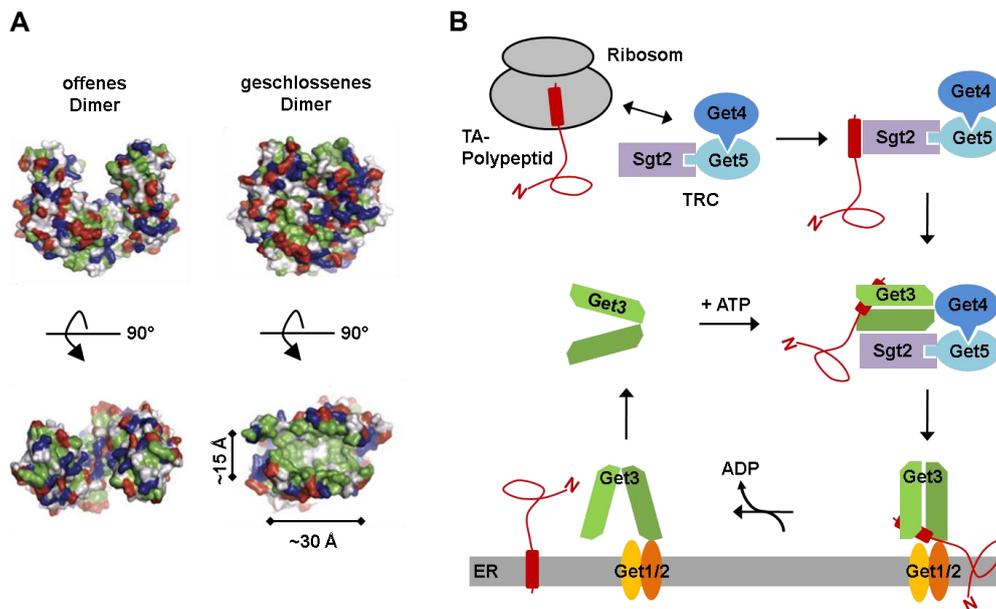


Abbildung 2.7: Modell des Get Pathways für die Zielsteuerung von TA-Proteinen zum ER

A) Oberflächendarstellung des Get3-Dimers. Dieses liegt ohne gebundenes Nukleotid in einer offenen Struktur vor und wechselt durch Bindung eines Nukleotids in eine geschlossene Konformation, wobei sich eine hydrophobe Furche bildet. Die ungefähre Größe dieser Furche ist auf der rechten Seite unten angegeben. Hydrophobe Reste sind in grün, positive und negative Reste in blau und rot dargestellt (modifiziert nach Mateja *et al.*, 2009). **B)** Modell des Get Pathways für die Zielsteuerung von TA-Proteinen zum ER. An diesem sind mehrere Chaperone, welche den sogenannten *TMD recognition complex* (TRC) bilden, beteiligt. Genaue Erklärungen sind dem Text zu entnehmen.

Im Säuger-System konnten außer Asna1/TRC40 bereits weitere homologe Komponenten identifiziert werden, jedoch wurde bis jetzt nur für wenige eine zum Hefe-System ähnliche Funktion in der TA-Protein Biogenese nachgewiesen (Borgese und Fasana, 2011). Die einzelnen Komponenten des Get Pathways sowie die entsprechenden homologen Proteine des Asna1/TRC40 Pathways und ihre vermuteten Aufgaben sind in Tabelle 2.2 zusammengefasst.

Tabelle 2.2: Komponenten des Get bzw. Asna1/TRC40 Pathway

Protein		Funktion im Pathway	Referenz
Hefe-System	Säuger-System		
Get3	Asna1/TRC40	ATPase, welche an die TMD von TA-Proteinen bindet und deren ER-Membraninsertion in einem ATP-abhängigen Mechanismus unterstützt.	(Stefanovic und Hegde, 2007; Favaloro <i>et al.</i> , 2008; Schuldiner <i>et al.</i> , 2008)
Get4	TRC35	Komplex aus Get4/5 rekrutiert TA-Proteine vom Ribosom zu Get3 und stabilisiert Interaktion von Get3 mit TA-Protein.	(Jonikas <i>et al.</i> , 2009; Mariappan <i>et al.</i> , 2010; Wang <i>et al.</i> , 2010)
Get5	Ubl4A	Protein mit Ubiquitin-ähnlicher Domäne. Rolle in der TA-Protein Biogenese siehe Get4/TRC35.	siehe Get4

Protein		Funktion im <i>Pathway</i>	Referenz
Hefe-System	Säuger-System		
Sgt2	SGTA	Interagiert mit Get4/5 und bindet TMD von TA-Proteinen. Rolle im Säuger-System noch unklar.	(Chang <i>et al.</i> , 2010; Leznicki <i>et al.</i> , 2010; Wang <i>et al.</i> , 2010)
-	Bat3	Protein mit Ubiquitin-ähnlicher- und BAG-Domäne. Spielt in der Chaperon-Kaskade vor Asna1 eine Rolle, liegt womöglich assoziiert mit dem Ribosom sowie dem TRC aus TRC35 und Ubl4A vor.	(Leznicki <i>et al.</i> , 2010; Mariappan <i>et al.</i> , 2010)
Get1	WRB (<i>tryptophan rich basic protein</i>)	Transmembran-Protein des ERs. Im Hefe-System bilden Get1 und Get2 den Get3-Rezeptor. Im Säuger-System fungiert WRB als Rezeptor für die TA-Membraninsertion.	(Schuldiner <i>et al.</i> , 2008; Rabu <i>et al.</i> , 2009; Vilardi <i>et al.</i> , 2011)
Get2	-	Rolle in der TA-Protein Biogenese siehe Get1.	siehe Get1

Seit der Entdeckung von Asna1/TRC40 als wichtigem Faktor für die Zielsteuerung von TA-Proteinen zur ER-Membran konnten während der letzten Jahre durch zahlreiche Studien bereits viele neue Erkenntnisse über diesen *Pathway* gewonnen werden. Diese stützen sich jedoch nur auf *in vitro* Daten, die nicht unbedingt die tatsächliche physiologische Situation widerspiegeln. Zukünftige *in vivo* Experimente sind somit unabdingbar für ein besseres Verständnis über den genauen Mechanismus der TA-Protein Biogenese.

2.4.2. Das Phospholipid Scramblase 1 (PLSCR1) Protein

Die Phospholipid Scramblase (PLSCR) Proteine bilden eine Familie, bestehend aus vier Proteinen (PLSCR1-4), welche konserviert in Eukaryoten zu finden sind (Wiedmer *et al.*, 2000). Der erste isolierte humane Vertreter dieser Familie wurde als PLSCR1 bezeichnet (Zhou *et al.*, 1997). Ursprünglich wurde es als Typ II-Transmembranprotein der Plasmamembran gefunden. Mit einem kurzen extrazellulären C-Terminus und einer großen cytoplasmatisch orientierten N-terminalen Domäne, die ein Cystein-reiches Palmitoylierungsmotiv und eine Kalzium-Bindestelle enthält, stellt es demzufolge ein TA-Protein dar. In rekonstituierten Proteoliposomen konnte gezeigt werden, dass PLSCR1 für die schnelle und unspezifische Umverteilung der Phospholipide (PL) zwischen den beiden Lipidschichten der Plasmamembran verantwortlich ist (Basse *et al.*, 1996). Durch diesen Kalzium-abhängigen, jedoch ATP-unabhängigen Prozess wird folglich die asymmetrische Verteilung der Phospholipide gestört, was Voraussetzung für viele biologische Vorgänge wie z.B. Apoptose, Signaltransduktion und Membrankrümmung sowie -fusion ist. Dabei kommt es zur Oberflächenexposition von Phosphatidylserin und anderen Amino-Phospholipiden, welche sich normalerweise in der inneren Lipidschicht der Plasmamembran befinden. Die Scramblase-Aktivität von PLSCR1 wird durch eine erhöhte intrazelluläre Kalzium-

Konzentration induziert, die als Folge von Zellverletzungen oder während der Apoptose entsteht. Vermutlich kommt es durch die Bindung von Kalzium an PLSCR1 zu einer Konformationsänderung, welche durch zusätzliche Palmitoylierungen stabilisiert wird. Die genaue Rolle dieses Proteins bei der Umverteilung von Phospholipiden sowie deren Mechanismus ist noch unklar und wird derzeit kontrovers diskutiert, da mehrere Beobachtungen darauf hindeuten, dass PLSCR1 dabei nicht essentiell oder zumindest nicht der alleinige Faktor im Scramblase *Pathway* der Plasmamembran ist. Während also die Funktion von PLSCR1 bei der Bewegung der Phospholipide innerhalb der Plasmamembran noch ungeklärt ist, lassen immer mehr Hinweise vermuten, dass es zusätzlich an der Regulation von diversen biologischen Prozessen beteiligt ist, wie an der Zellproliferation und -reifung, der Apoptose, der Transkription und an Signaltransduktionswegen der Zelle durch das Zusammenspiel mit verschiedenen Cytokinen und Wachstumsfaktoren (Sahu *et al.*, 2007). Dabei wird PLSCR1 selbst auf transkriptionaler Ebene durch Cytokine wie Interferone (INF) reguliert, welche für viele biologische Aktivitäten wie z.B. anti-virale, anti-proliferierende oder immun-modulierende Funktionen verantwortlich sind. Da eine fast 100-fach erhöhte Expression von PLSCR1 bei Aktivierung durch INF α gemessen werden konnte, gehört PLSCR1 zur IFN-stimulierten Genfamilie, welche die JAK/STAT-Signalkaskade für ihre Expression benötigt (Zhou *et al.*, 2000). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass diese durch INF α -induzierten *de novo* synthetisierten Proteine eine nukleäre Lokalisation aufweisen. Ebenso wird PLSCR1 auch bei Bedingungen, welche eine Palmitoylierung des Proteins verhindern, in den Zellkern transportiert. Somit stellt die Palmitoylierung einen Schalter dar, mit welchem die Lokalisierung entweder zur Plasmamembran oder zum Zellkern kontrolliert werden kann (Wiedmer *et al.*, 2003). Eine nukleäre Lokalisation erfordert jedoch, dass die Bindung an die Plasmamembran reversibel ist. In einer kürzlich erschienen Arbeit wurden die Proteine der PLSCR1-Familie mit einem direkt verwandten zellulären Protein mit bereits bekannter Struktur verglichen. In diesem Modell liegt die putative C-terminale TMD innerhalb des Proteinkerns, so dass vermutet wird, dass die Palmitoylierung die alleinige Verankerung des Proteins darstellt (Bateman *et al.*, 2009). Durch die Identifizierung einer nicht-klassischen NLS, über welche PLSCR1 an Importin α bindet, konnte gezeigt werden, dass der Transport in den Zellkern aktiv über den Importin α /Importin β -Rezeptorkomplex erfolgt. Dort wird es durch direkte Bindung an genomische DNA oder damit assoziierten nukleären Komponenten zurückgehalten. Ein *leucine zipper* Motiv innerhalb der N-terminalen Domäne von PLSCR1, das üblicherweise als ein Dimerisierungsmotiv bei vielen Transkriptionsfaktoren gefunden wird, könnte dabei ein Hinweis auf eine potentielle nukleäre Funktion bei der transkriptionalen Genregulation sein (Ben-Efraim *et al.*, 2004). In der Tat konnte bereits gezeigt werden, dass PLSCR1 direkt an die 5' Promotor-Region des Inositol 1,4,5-Triphosphat Rezeptor Typ 1 (IP3R1) Gens bindet und dessen Expression erhöht. Der IP3

Rezeptor ist ein intrazellulärer Kalzium-Kanal und reguliert die durch den sekundären Botenstoff IP₃ vermittelte Kalzium-Freisetzung aus den intrazellulären Kalziumspeichern des ER. Auch Kalzium-Ionen selbst sind zentrale Signalmoleküle innerhalb der Zelle, welche u.a. für die Aktivierung der zellulären Proteinkinase C benötigt wird. Ob PLSCR1 hier als direkter Transkriptionsfaktor für das IP₃R1 Gen oder als Coaktivator für andere Transkriptionsfaktoren fungiert und ob auch die Transkription weiterer Gene von PLSCR1 beeinflusst wird, muss noch genauer untersucht werden. Es wurde aber bereits berichtet, dass PLSCR1 an drei weitere Promotor-Fragmente von noch nicht charakterisierten Genen bindet (Zhou *et al.*, 2005).

Aufgrund der vielseitigen Funktionen von PLSCR1 bei Signalübertragungen, Apoptose, Zelldifferenzierung und Transkription sowie beim Scramblase *Pathway* der Plasmamembran wäre es gut denkbar, dass dieses Protein auch mehrere wichtige Funktionen beim herpesviralen Replikationszyklus innehat und somit einen potentiellen zellulären Regulator der HSV-1 Infektion darstellt.

2.5. Zielsetzung der Arbeit

Während der Auswanderung der Nukleocapside aus der Wirtszelle kommt es zu zwei Knospungsereignissen, bei welchen die Capside umhüllt werden. Das erste findet an der inneren Kernmembran (INM) statt und bewirkt, dass primär umhüllte Virionen in den perinukleären Raum und durch anschließende Fusion mit der äußeren Kernmembran ins Cytoplasma der Wirtszelle gelangen, wobei sie ihre primäre Umhüllung wieder verlieren. Durch einen weiteren Knospungsprozess an cytoplasmatischen Membranen erhalten sie schließlich ihre endgültige Virushülle. Für die Auswanderung der neu gebildeten Nukleocapside aus dem Zellkern (*nuclear egress*) wird der Kernauswanderungskomplex (NEC) benötigt, welcher aus den zwei essentiellen viralen Proteinen UL34 und UL31 besteht. Für ihre Funktionsausübung und somit auch für den weiteren Replikationsverlauf ist eine ausschließlich nukleäre Lokalisation beider Proteine zwingend erforderlich. In beiden Proteinen konnte mittels bioinformatischer Methoden ein Kernlokalisierungssignal (NLS) identifiziert werden. Die Verankerung des NEC an der INM wird schließlich von UL34, einem viralen *tail anchor* (TA) Protein, vermittelt. TA-Proteine sind durch eine einzelne C-terminale hydrophobe Region, welche für eine post-translationale Membraninsertion zuerst vom Ribosom freigelassen werden muss, gekennzeichnet. Die TA-Region enthält normalerweise auch alle Informationen bezüglich der Zielsteuerung der TA-Proteine.

Im Fokus dieser Arbeit stand das *targeting* der HSV-1 NEC-Proteine UL31 und UL34, d.h. der genaue Mechanismus der Zielsteuerung zur INM. Durch funktionale Charakterisierung des TA von UL34 sollten dabei erste mechanistische Einblicke über dessen Rolle bei der Membraninsertion und -verankerung, der Zielsteuerung zur INM sowie viralen Funktion

gewonnen werden. Desweiteren sollten im Rahmen dieser Forschungsarbeit die identifizierten NLS Sequenzen von UL34 und UL31 auf ihre Essentialität und Funktion untersucht werden, um genauere Hinweise über den Kerntransport der NEC-Proteine zu erlangen. Mit Hilfe der BAC Mutagenese wurde dabei die funktionale Analyse im viralen Kontext ermöglicht.

An der HSV-1 Morphogenese sind außer zahlreichen viralen Proteinen auch zelluläre Proteine sowie zelluläre Strukturen beteiligt. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es daher, neue Virus-Wirt-Interaktionen der HSV-1 NEC Proteine zu identifizieren und deren Einfluss auf die herpesvirale Replikation durch funktionale Analysen zu bestimmen. Aktuelle zellbiologische Daten deuten auf eine wichtige Rolle von Asna1 bei der Biogenese und der Zielsteuerung von TA-Proteinen hin. Außer dem NEC-Protein UL34 kodiert HSV-1 noch für zwei weitere TA-Proteine. Die Bedeutung des TA-Insertionsfaktors Asna1 für die Biogenese dieser herpesviralen TA-Proteine sollte mittels RNA Interferenz im Detail untersucht werden. Beim zweiten Wirtsfaktor, welcher in dieser Arbeit analysiert werden sollte, handelte es sich um die multifunktionale Phospholipid Scramblase 1 (PLSCR1). Diese konnte bereits im Vorfeld durch einen genomweiten Y2H *screen* mit den HSV-1 NEC-Proteinen in Verbindung gebracht werden. Die Charakterisierung dieser ausgewählten Virus-Wirt-Interaktionen könnte zum einen dazu beitragen, ein besseres mechanistisches Verständnis des *nuclear egress* bzw. herpesviralen Lebenszyklus zu gewinnen, zum anderen können auch neue Angriffspunkte für die antivirale Therapie einer HSV-1 Infektion gefunden werden.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Material

3.1.1. Laborgeräte und Software

ABI Prism 7000 mit Software	Applied Biosystems, Foster City, USA
Adobe Photoshop CS5	Adobe Systems Incorporated, San Jose, USA
ApE A Plasmid Editor	Wayne Davis, University of Utah, USA
Brutschränke	Memmert, Schwabach, D
DNAMAN 6.0	Lynnon Corporation, Pointe-Claire, CA
Eppendorf Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, D
Expositionskassette für Western Blots, Hypercassette™	Amersham Biosciences, Freiburg, D
Filmentwickler FPM-100A	Fujifilm, Düsseldorf, D
Fluoreszenzmikroskop DM4000B mit DFC 360 FX Digitalkamera und LAS AF6000 Software	Leica, Mannheim, D
Geldokumentationssystem Eagle Eye mit EasyWin 32 Software	Herolab, Wiesloch, D
Gene Pulser Xcell	BioRad, Mannheim, D
GraphPad Prism 5	GraphPad Software
Inkubationsschüttler	Kühner, Basel, CH
Kammern für Agarosegelelektrophorese	Peqlab, Erlangen, D
Kippschüttler	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, D
Konfokales Laser Scanning Mikroskop TCS SP5 mit LAS AF Software	Leica, Mannheim, D
Kühlschrank (4°C),	Liebherr, Ochsenhausen, D
Kühlzentrifuge 6K15	Sigma Laboratory Centrifuges, Osterode am Harz, D
Magnetrührer mit Heizplatte	Janke & Kunkel, Staufen, D
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen, D
Mikrowelle	AEG, Berlin, D
Nasstransfersystem Mini-Protean II	Biorad, Mannheim, D
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld, Lauda, D
PCR Thermocycler	Applied Biosystems, Foster City, USA
pH Meter	WTW, Weilheim, D
Pipetten (20, 200, 1000µl)	Gilson, Middleton, USA
Pipettierhilfe, Accu-Jet Pro	Brand, Wertheim, D
Proteinelektrophorese System Mini-Protean II	Biorad, Mannheim, D
Spannungsquellen für die Elektrophorese	Biorad, Mannheim, D
Spektrometer Libra S12	Biochrom, Berlin, D
Sterilbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen, D
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, D
Tiefkühlschrank (-20°)	Liebherr, Ochsenhausen, D
Tiefkühltruhe (-80°C)	Forma Scientific Inc., Marietta, Ohio, USA
Tischautoklav, LTA 1x2x3	Zirbus Technology, Bad Grund, D
UV-Transilluminator	LKB, Freiburg, D

Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe, D
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, D
Kalium Hydroxid Plätzchen	Roth, Karlsruhe, D
Kalziumchlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt, D
Kanamycin Sulfat	Roth, Karlsruhe, D
Kristallviolett	Sigma Aldrich, München, D
L-Adenin	Sigma Aldrich, München, D
L-Leucin	Sigma Aldrich, München, D
L-Tryptophan	Sigma Aldrich, München, D
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe, D
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Roth, Karlsruhe, D
Mangan(II)-Chlorid-Tetrahydrat	Roth, Karlsruhe, D
Methanol	Roth, Karlsruhe, D
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, D
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe, D
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, D
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, D
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, D
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe, D
Polyethylenglykol 1000 (PEG 1000)	Sigma Aldrich, München, D
Ponceau S	Roth, Karlsruhe, D
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1) Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe, D
Salzsäure	Roth, Karlsruhe, D
Spektinomycin Dihydrochlorid	Sigma Aldrich, München, D
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe, D
Triton X-100	Roth, Karlsruhe, D
Tween 20	Roth, Karlsruhe, D

3.1.3. Verbrauchsmaterialien

0,5% Trypsin-EDTA (1x)	Invitrogen, Karlsruhe, D
-Ade/-His/-Leu/-Trp DO Supplement	Clontech, Mountain View, USA
Ampuwa ad injectabilia	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, D
Aqua ad injectabilia	Braun, Melsungen, D
Deckgläser, 12mm rund	Roth, Karlsruhe, D
DharmaFECT 1 Transfektionsreagenz	Dharmacon, Lafayette, USA
DNA-Ladepuffer (6x)	Fermentas, St. Leon-Rot, D
dNTP Mix [jeweils 10mM]	Promega, Madison, USA
Dulbecco's Phosphate-buffered Saline (PBS)	Invitrogen, Karlsruhe, D
ECL Plus Western Blotting Detection System	Amersham Biosciences, Freiburg, D
Effectene Transfektionsreagenz	Qiagen, Hilden, D
Einmal-Impfösen, steril	Nunc, Langenselbold, D
Falcon-Röhrchen (15 und 50 ml)	Nunc, Langenselbold, D
Fötale Kälberserum (FCS)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Glaswaren	Duran, Schott, Mainz, D

HBSS (<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Hexanukleotid Random-Primer-Mix	Promega, Madison, USA
Immersionsöl	Leica, Mannheim, D
Kryo-Röhrchen	Nunc, Langensfeld, D
Kunststoffküvetten für Photometer	Sarstedt, Nümbrecht, D
-Leu/-Trp DO Supplement	Clontech, Mountain View, USA
L-Glutamin-Lösung (200 mM)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Lipofectamin 2000 Transfektionsreagenz	Invitrogen, Karlsruhe, D
MacConkey Agar	Sigma Aldrich, München, D
Minimal SD Base	Clontech, Mountain View, USA
Mounting Medium	Dianova, Hamburg, D
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA, 100x)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Nitrocellulosemembran	Schleicher und Schüll, Dassel, D
Objektträger	Roth, Karlsruhe, D
Penicillin/Streptomycin-Lösung (100x)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Petrischalen	Greiner Bio One, Frickenhausen, D
Pipettenspitzen	Peske GmbH & Co.KG, Aindlingen, D
Reaktionsgefäße (2, 1,5 und 0,5 ml)	Eppendorf, Hamburg, D
Röntgenfilm Cronex 5	Agfa, Leverkusen, D
ROX Referenzfarbstoff	Invitrogen, Karlsruhe, D
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht, D
Sterilfilter (0,22 und 0,45 µm)	Millipore, Billerica, USA
Sterilfiltrationseinheiten (250 ml)	Nunc, Langensfeld, D
Trizol-Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe, D
Trypanblau Färbelösung (0,4%)	Sigma-Aldrich, München, D
Whatman 3MM-Papier	Whatman, Maldstone, UK
Zellkulturmedium 10x MEM (<i>Minimum Essential Medium</i>)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Zellkulturmedium D-MEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Zellkulturmedium D-MEM/F12 (1:1)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Zellkulturmedium Opti-MEM	Invitrogen, Karlsruhe, D
Zellkulturmedium RPMI-1640	Invitrogen, Karlsruhe, D
Zellkulturschalen (15- und 10-cm, 6-, 12- und 24-well)	Nunc, Langensfeld, D

3.1.4. Fertigsätze (Kits)

High Pure Viral Nucleic Acid Kit	Roche Diagnostics, Mannheim, D
NucleoBond Xtra Midi Kit	Macherey & Nagel, Düren, D
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden, D
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, D
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, D

3.1.5. Enzyme und Molekulargewichtsstandards

Antarctic Phosphatase	NEB, Frankfurt am Main, D
Benchmark Protein Ladder	Invitrogen, Karlsruhe, D

BP-Clonase Mix	Invitrogen, Karlsruhe, D
HotStar HiFidelity Polymerase Kit	Qiagen, Hilden, D
Gene Ruler 1kb DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, D
LR-Clonase Mix	Invitrogen, Karlsruhe, D
Quick Ligation Kit	NEB, Frankfurt am Main, D
Quikchange Site-directed Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla, USA
Restriktionsendonukleasen	NEB, Frankfurt am Main, D
SuperScript™ II Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe, D
TaqMan Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, USA
TaqMan Universal Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, USA

3.1.6. Antikörper und Seren

3.1.6.1. Primäre Antikörper

Tabelle 3.1: Verwendete Primärantikörper und Seren

Antikörper	Herkunft	Anwendung (Verdünnung)	Quelle
anti-Asna1 [M03] Klon 2H3	Maus (monoklonal)	IF (1:100) WB (1:500)	Abnova, Heidelberg, D
anti-β-Aktin	Maus (monoklonal)	WB (1:1000)	abcam, Cambridge, UK
anti-Calretikulin	Kaninchen (polyklonal)	IF (1:100)	Sigma, München, D
anti-Giantin	Kaninchen (polyklonal)	IF (1:500)	abcam, Cambridge, UK
anti-Glykoprotein B [vC-14]	Ziege (polyklonal)	WB (1:500)	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA
anti-ICP0 [11060]	Maus (monoklonal)	IF (1:2000) WB (1:200)	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA
anti-ICP5 (VP5) [3B6]	Maus (monoklonal)	WB (1:2000)	abcam, Cambridge, UK
anti-ICP8	Maus (monoklonal)	IF (1:300)	R. Heilbronn, Charité, Berlin, D
anti-ICP27	Maus (monoklonal)	WB (1:250)	Virusys Corporation, Taneytown, USA
anti-Lamin A/C [636]	Maus (monoklonal)	IF (1:100)	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA
anti-Lamin B [C-20]	Ziege (polyklonal)	WB (1:500)	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA
anti- <i>myc-tag</i>	Kaninchen (polyklonal)	IF (1:300)	Cell Signalling Technology, Danvers, USA
anti- <i>c-myc</i> [9E10]	Maus (monoklonal)	IF (1:300)	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA
anti-PLSCR1 [N-17]	Ziege (polyklonal)	IF (1:50)	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA
anti-PLSCR1 [4D2]	Maus (monoklonal)	WB (1:500)	P. Sims, University of Rochester, USA
anti- <i>Strep-tagII</i>	Maus (monoklonal)	IF (1:100)	IBA, Göttingen, D
anti-human TGN46	Kaninchen (polyklonal)	IF (1:100)	AbD SeroTec, München, D
anti-UL31	Kaninchenserum (polyklonal)	IF (1:50)	B. Roizman, University of Chicago, USA
anti-UL32	Kaninchenserum (polyklonal)	IF (1:500)	B. Roizman, University of Chicago, USA
anti-UL34	Kaninchenserum (polyklonal)	IF (1:300) WB (1:300)	diese Studie
anti-VP5 [8F5]	Maus (monoklonal)	IF (1:200) erkennt VP5 ausschließlich in reifen Capsiden	J. Brown, University of Virginia, Charlottesville, USA

3.1.6.2. Sekundäre Antikörper

Tabelle 3.2: Verwendete Sekundärantikörper

Antikörper	Herkunft	Anwendung (Verdünnung)	Quelle
Alexa Fluor 488 anti-Kaninchen IgG	Ziege	IF (1:500)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Alexa Fluor 488 anti-Maus IgG	Ziege	IF (1:500)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Alexa Fluor 488 anti-Ziege IgG	Affe	IF (1:500)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Alexa Fluor 594 anti-Kaninchen IgG	Affe	IF (1:500)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Alexa Fluor 594 anti-Kaninchen IgG	Ziege	IF (1:500)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Alexa Fluor 594 anti-Maus IgG	Affe	IF (1:500)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Alexa Fluor 594 anti-Maus IgG	Ziege	IF (1:500)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Peroxidase-gekoppelt anti-Kaninchen IgG	Ziege	WB (1:3000)	Dianova, Hamburg, D
Peroxidase-gekoppelt anti-Maus IgG	Ziege	WB (1:3000)	Dianova, Hamburg, D
Peroxidase-gekoppelt anti-Ziege IgG	Kaninchen	WB (1:3000)	Dianova, Hamburg, D

3.1.7. Oligonukleotide

Alle verwendeten DNA-Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion synthetisiert.

3.1.7.1. Oligonukleotide für die Rekombinationsklonierung

Tabelle 3.3: Verwendete Oligonukleotide für die Rekombinationsklonierung

Nr.	Name	Sequenz (5'→3')
1	PLSCR1 wt for	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGCCATGGACAAACA</u> AAACTCAC
2	PLSCR1 ₁₋₂₈₈ rev	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTATTTAACATCAAG</u> GTCTAAAG
3	PLSCR1 ₁₋₁₀₅ rev	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTATATCTGACTTAA</u> TATTC
4	PLSCR1 ₁₀₆₋₂₈₈ for	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGCCATGGATCAGAT</u> ACTGATTC

Rekombinationssequenzen (*attB1* und *attB2*) sind unterstrichen

3.1.7.2. Oligonukleotide für die Herstellung von Expressionsvektoren

Tabelle 3.4: Verwendete Oligonukleotide für die Herstellung von Expressionsvektoren

Nr.	Name	Sequenz (5'→3')
5	<i>XhoI</i> -UL34 for	TTTCTCGAGGGCGGGACTGGGCAA
6	<i>EcoRV</i> -UL34 rev	TTTGATATCTTATAGGCGCGCGCCA
7	<i>EcoRV</i> -UL34s272 rev	TTTGATATCTTAGCCAGCACCAACCA
8	<i>EcoRV</i> -UL34s269 rev	TTTGATATCTTAAACCACCCACCAAAT
9	<i>EcoRV</i> -UL34s263 rev	TTTGATATCTTAGCCCCCAGGACCAGT
10	<i>EcoRV</i> -UL34s260 rev	TTTGATATCTTAGACGAGTCCCGCCCGCC
11	<i>EcoRV</i> -UL34s256 rev	GTGGATATCTTACGCCAAAACGA
12	<i>HindIII</i> -Strep-UL34 for	TTTAAGCTTATGGCTAGCTGGAGCCA
13	<i>AgeI</i> -UL34 ₁₋₂₅₁ rev	TTTAACCGGTGGGCCAATCCGTAG
14	<i>AgeI</i> -UL50tail for	TTACCGGTTTTTGCGACTCTGGGC
15	<i>EcoRV</i> -UL50tail rev	TTTGATATCTCAGTCGCGGTGTGC
16	<i>AgeI</i> -BFRF1tail for	TTACCGGTTGCACGGGTGCTGG
17	<i>EcoRV</i> -BFRF1tail rev	TATGATATCTCAGGTCCACCTCAG
18	<i>AgeI</i> -UL56tail for	CCACCGGTGGTGGTGTGGCGC

Nr.	Name	Sequenz (5'→3')
19	<i>EcoRV</i> -UL56tail rev	TTT <u>GATATCT</u> AAGAGTCACTTTAAAATTT
20	<i>AgeI</i> -US9tail for	TT <u>ACCGGT</u> TATCGCCTGTCTCCTC
21	<i>EcoRV</i> -US9tail rev	TTT <u>GATATCT</u> TAGCGGAGCAGCCA
22	<i>AgeI</i> -Bcl2tail for	TT <u>ACCGGT</u> TACTCTGCTCAGTTTGG
23	<i>EcoRV</i> -Bcl2tail rev	TTTGTGATGG <u>AATCT</u> GCAGAATTC
24	<i>AgeI</i> -Vamp2tail for	TT <u>ACCGGT</u> TATGATGATCATCTTGGG
25	<i>EcoRV</i> -Vamp2tail rev	TAT <u>GATATCG</u> AAACAGCCTATACAGC

Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen

3.1.7.3. Oligonukleotide für die Herstellung von Klonierungsvektoren

Tabelle 3.5: Verwendete Oligonukleotide für die Herstellung von Klonierungsvektoren

Nr.	Name	Sequenz (5'→3')
26	<i>XbaI</i> -UL34-BAC for	TCCCAGACCCTGGAGAGTCT <u>AG</u> A
27	<i>HindIII</i> -UL34-BAC rev	ATAAAGCTTAGTTTCGAACCGTCGAA
28	<i>NcoI</i> -UL34 for	TATAC <u>CCATGG</u> CGGACTGGGCAA
29	<i>SfiI</i> -UL34s269 rev	TAATCTATAGCTAAACCACCCACCAAAT
30	<i>SfiI</i> -UL34s267 rev	AATACTATAGCTACCACCAAATAGCG
31	<i>SfiI</i> -UL34s265 rev	AATACTATAGCTAAATAGCGGCC
32	<i>SfiI</i> -UL34s251 rev	AATACTATAGCTAGGGGGGGCCAATCCGTAG
33	<i>SfiI</i> -UL50tail rev	TATACTATAGCTAGTCGCGGTGTGCG
34	<i>SfiI</i> -BFRF1tail rev	TATACTATAGCTAGGTCCACCTCAGAA
35	<i>SfiI</i> -UL56tail rev	TATACTATAGCTACCGCCACAGGAATAC
36	<i>SfiI</i> -US9tail rev	TATACTATAGCTAGCGGAGCAGCCACA
37	<i>SfiI</i> -Bcl2tail rev	TATACTATAGCTACTTGTGGCCAGATA
38	<i>SfiI</i> -Vamp2tail rev	TTACCTATAGCTAAGTGCTGAAGTAAACG
39	<i>SfiI</i> -prelaminA tail rev I	GTTCCGGGGGCTGGAGTTGCCAGGAGGTAGGAGCGGGGGGGGC CAATCCGTAGGTG
40	<i>SfiI</i> -prelaminA tail rev II	TATACTATAGTTACATGATGCTGCAATTCTGGGGGCTCTGGGTTCCG GGGGCTGGAGTTG
41	<i>SpeI</i> -UL34Δ236-251 for	TATACTAGTTTTGGCGGCGGGAC
42	<i>SpeI</i> -UL34Δ236-251 rev	TATACTAGTGCCGGCGGGAGGGC

Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen

3.1.7.4. Oligonukleotide für die zielgerichtete Mutagenese

Tabelle 3.6: Verwendete Oligonukleotide für die zielgerichtete Mutagenese

Nr.	Name	Sequenz (5'→3')
43	UL34s267 for	GCCGCTATTTGGTGGT <u>AG</u> GTTGGTGCTGGCGCG
44	UL34s267 rev	CGCGCCAGCACCAACCT <u>ACC</u> ACCAAATAGCGGC
45	UL34s265 for	CTGGGGGCGCCTATTT <u>AG</u> TGGGTGGTTGGTGCT
46	UL34s265 rev	AGCACCAACCACCCACT <u>AA</u> ATAGCGGCCCCAG
47	<i>SfiI</i> -UL34 BAC for	GCTGGCGCGCGCCTATAG <u>AAA</u> AGGACGCAC
48	<i>SfiI</i> -UL34 BAC rev	GTGCGTCCTTTTCTATAGCGCGCGCCAGC
49	UL34NLSmt for	CGCCGAGCAGGCTATTACCCGT <u>ACAACA</u> ACACCCGGCGGTCCC GGG
50	UL34NLSmt rev	CCCCGGGACCGCCGGGT <u>GTTGTTGTT</u> ACGGGTAATAGCCTGCTC GGCG
51	UL31NLSmt_1 for	CCCTATCACGGCAAGGAG <u>ACGCGG</u> CGTCGCGCTCCTCTGCG
52	UL31NLSmt_1 rev	CGCAGAGGAGCGCGAC <u>GCCGCTT</u> CTCCTTGCCCTGATAGGG
53	UL31NLSmt_2 for	CTCTGGGCGTGGTGA <u>ATGCGG</u> CCTCC <u>GGA</u> AGAGCCTGCCGCC

Nr.	Name	Sequenz (5'→3')
54	UL31NLSmt_2 rev	GGCGGCAGGCTCTTC <u>GC</u> GGAGGCC <u>GC</u> ATTACCCACGCCAGAG

Punktmutationen sind unterstrichen

3.1.7.5. Oligonukleotide für die BAC-Mutagenese

Tabelle 3.7: Verwendete Oligonukleotide für die BAC-Mutagenese

Nr.	Name	Sequenz (5'→3')
55	H5-UL34/gk	GAACCCTTTGGTGGGTTTACGCGGGCAGCAGCAGCTCCCATCGCG GGCGCC <u>CT</u> GTTGACAATTAATCATCGGCA
56	H3-UL34/gk	GCGAAGGCGTCCGGAACGCACTGGCGATTAGGGCGGCGGTGCGT CCTTTT <u>GCC</u> AGTGTTACAACCAATTAACC
57	H5-UL31/gk	CGGAGGAAACTCGTCAATGTTGCATAGAGCCTTTGATACTCTAG CATGAC <u>CT</u> GTTGACAATTAATCATCGGCA
58	H3-UL31/gk	CTCGATCTCGTCTCCTGTCCCTGGAGCACACCCTGTGTACCTATGT ATGAG <u>CC</u> AGTGTTACAACCAATTAACC
59	H3-UL31/gk-revertant	CTCGATCTCGTCTCCTGTCCCTGGAGCACACCCTGTGTACCTACGT ATGAG <u>CC</u> AGTGTTACAACCAATTAACC
60	UL31NLSmt for	CTACGGCGGAGGAAACTCGTCAATGTTGCATAGAGCCTTTGATA CTCTAGCATG
61	UL31NLSmt rev	CTTAGACGCCACTCGATCTCGTCTCCTGTCCCTGGAGCACACCCTG TGTACCTATGTATGACACAGACCCCATC
62	SV40NLS-UL31mt rev	GACGCCACTCGATCTCGTCTCCTGTCCCTGGAGCACACCCTGTGTA CCTacgtatga ATGCCAAAAAAGAAGAGAAAG
63	UL31NLSmt-revertant rev	CTCGATCTCGTCTCCTGTCCCTGGAGCACACCCTGTGTACCTacgtatg aATGTATGACACCGACCCC
64	BAC-UL34-Sequenzierung	GACCGGAGGTCGGGAAG
65	BAC-UL31-Sequenzierung	GACGTATCAGGTATTTGTACCAAAGCC

Homologien zur *galk*-kan Selektionskassette sind unterstrichen

Homologien zur SV40 NLS Sequenz sind hervorgehoben

Punktmutationen sind durch kursive Buchstaben gekennzeichnet

Duplizierte Sequenzen sind durch Kleinbuchstaben gekennzeichnet

3.1.7.6. Oligonukleotide für die Quantifizierung von HSV-1 Genomkopien

Tabelle 3.8: Verwendete Oligonukleotide für die Quantifizierung von HSV-1 Genomkopien

Name	Sequenz (5'→3')
HSV-1 Primer 1	ACGTTCAACAAGCTGCTGCT
HSV-1 Primer 2	CACGCCCTTGATGAGCATCTT
HSV-1 Sonde	FAM-CGCCAAGAAAAAGTACATCGGCGTCATCT-TAMRA

5'-FAM = 5-Carboxyfluorescein, 3'-TAMRA = 5-carboxytetramethylrhodamine

3.1.7.7. Oligonukleotide für die Quantifizierung von Transkripten (TaqMan)

Tabelle 3.9: Verwendete Oligonukleotide für die Quantifizierung von Transkripten (TaqMan)

Name	Sequenz (5'→3')	TaqMan Sonde (Roche Mouse Library)
RT_HPRT1 for	TGACCTTGATTTATTTGCATACC	Mouse #54
RT_HPRT1 rev	CGAGCAAGACGTTCAATCCT	
RT_ICP0 for	ACCACCATGACGACGACTC	Mouse #43
RT_ICP0 rev	AGCCCCGTCTCGAACAGT	
RT_ICP27 for	TCCGACAGCGATCTGGAC	Mouse #43
RT_ICP27 rev	TCCGACGAGGAACACTCC	
RT_gB for	GTCAGCACCTTCATCGACCT	Mouse #7

Name	Sequenz (5'→3')	TaqMan Sonde (Roche Mouse Library)
RT_gB rev	CAGGGGGACAAACTCGTG	
RT_UL34 for	TCTTAAGCACCTACGGATTGG	Mouse #47
RT_UL34 rev	ACCAACCACCCACCAAATAG	
RT_VP5 for	AGCCTGTACGACGTGCGAGTT	Mouse #2
RT_VP5 rev	ACGAGCGACAGGGTGTG	

3.1.7.8. siRNA-Oligonukleotide

Alle verwendeten RNA-Oligonukleotide wurden von der Firma Dharmacon synthetisiert.

Tabelle 3.10: Verwendete siRNA-Oligonukleotide

Name	Sequenz (5'→3')
Asna1_1	GAUCAGCCCUUUAUCUCA
Asna1_2	GCGUAUGCAUUGCUGAGUU
Asna1_3	GAACUUCUCGGUGGUGGUA
Asna1_4	CAGGAGGCCAUGAGCGCAU
<i>ctrl</i>	UUCUCCGAACGUGUCACGU
PLSCR1_1	CUACCAAAGUUUACAAUUC
PLSCR1_2	UUACAGACGCUGAUAAUUU
PLSCR1_3	CUUUAGACCUUGAUGUUAA
PLSCR1_4	ACUGAUUGCUGUACCCGAA

3.1.8. Plasmide

3.1.8.1. Gateway®-kompatible Leervektoren

Tabelle 3.11: Verwendete Gateway®-kompatible Leervektoren

Vektor	Charakteristika	Herkunft
pDONR207	<i>entry</i> Vektor	Invitrogen, Karlsruhe
pGBKT7-DEST	Zielvektor, enthält BD für Hefe-2-Hybrid-System	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
pGADT7-DEST	Zielvektor, enthält AD für Hefe-2-Hybrid-System	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
pCR3-N- <i>c-myc</i>	Zielvektor, eukaryotischer Expressionsvektor mit N-terminalem <i>c-myc-tag</i>	A. Baiker, München
pTREX	Zielvektor, eukaryotischer Expressionsvektor mit N-terminalem Protein A- <i>tag</i> zur Verwendung im modifizierten LUMIER Assay	M. Kögl, Heidelberg
pcDNA3-Rluc	Zielvektor, eukaryotischer Expressionsvektor mit N-terminaler Renilla Luciferase zur Verwendung im modifizierten LUMIER Assay	M. Kögl, Heidelberg

3.1.8.2. Gateway®-kompatible Vektorkonstrukte

Tabelle 3.12: Verwendete Gateway®-kompatible Vektorkonstrukte

Vektor	Insert	Herkunft
pDONR223-Asna1 (*1)	humanes Asna1 (As. 1-349)	MGC-Kollektion
pDONR221-PLSCR1 (*1, 3, 4, 5)	humanes PLSCR1 (As. 1-319)	M. Kögl, Heidelberg
pDONR223-PLSCR3 (*1)	humanes PLSCR3 (As. 1-296)	MGC-Kollektion
pDONR223-PLSCR4 (*1)	humanes PLSCR4 (As. 1-240)	MGC-Kollektion
pDONR207-PLSCR1 ₁₋₂₈₈ (*1)	humanes PLSCR1 (As. 1-288)	diese Studie
pDONR207-PLSCR1 ₁₋₁₀₅ (*1)	humanes PLSCR1 (As. 1-105)	diese Studie

Vektor	Insert	Herkunft
pDONR207-PLSCR1 ₁₀₆₋₂₈₈ (*1)	humanes PLSCR1 (As. 106-288)	diese Studie
pDONR207-Importin α 1 (*2)	humanes Importin α 1 (As. 1-529)	V. Raschbichler, München
pDONR207-Importin α 3 (*2)	humanes Importin α 3 (As. 1-521)	V. Raschbichler, München
pDONR207-Importin α 6 (*2)	humanes Importin α 6 (As. 1-539)	V. Raschbichler, München
pDONR207-UL34 VL (*2)	HSV-1 UL34 (As. 1-275)	Laborkollektion
pDONR207-UL34 A (*1,2,4,5)	HSV-1 UL34 (As. 1-252)	Laborkollektion
pDONR207-UL34 ₁₋₂₀₃ (*2)	HSV-1 UL34 (As. 1-203)	Laborkollektion
pDONR207-UL34 ₁₋₁₄₇ (*2)	HSV-1 UL34 (As. 1-147)	Laborkollektion
pDONR207-UL34 ₅₁₋₁₈₀ (*2)	HSV-1 UL34 (As. 51-180)	Laborkollektion
pDONR207-UL34 ₇₅₋₁₈₀ (*2)	HSV-1 UL34 (As. 75-180)	Laborkollektion
pDONR207-UL31 VL (*1,2,3,4,5)	HSV-1 UL31 (As. 1-307)	Laborkollektion
pDONR207-UL31 NLSmt 1 (*1)	HSV-1 UL31 (R21N, R22A, R23A)	diese Studie
pDONR207-UL31 NLSmt 2 (*1)	HSV-1 UL31 (R37N, R38A, R41A)	diese Studie
pDONR207-UL31 NLSmt 3 (*1)	HSV-1 UL31 (NLSmt 1 & 2))	diese Studie
pDONR207-UL43 VL (*3)	HSV-1 UL43 (As. 1-434)	Laborkollektion
pDONR207-UL43 B (*2,4,5)	HSV-1 UL43 (As. 214-365)	Laborkollektion
pDONR207-UL45 VL (*2)	HSV-1 UL45 (As. 1-173)	Laborkollektion
pDONR207-UL56 VL (*2,3)	HSV-1 UL56 (As.1-235)	Laborkollektion
pDONR207-U9 VL (*2,3)	HSV-1 U9 (As. 1-91)	Laborkollektion
pDONR207-VZVOrf27 VL (*2)	VZV Orf 27 (As. 1-312)	Laborkollektion
pDONR207-VZVOrf24 Δ TMD (*2)	VZV Orf 24 (As. 1-245)	Laborkollektion
pDONR207-VZVOrf15 VL (*2)	VZV Orf 15 (As. 1-407)	Laborkollektion
pDONR207-VZVOrf15 N (*2)	VZV Orf 15 (As. 1-47)	Laborkollektion
pDONR207-VZVOrf15 F (*2)	VZV Orf 15 (As. 203-270)	Laborkollektion
pDONR207-M50 Δ TMD (*2)	MCMV M50 (As. 1-360)	Laborkollektion
pDONR207-M53 VL (*2)	MCMV M53 (As. 1-376)	Laborkollektion
pDONR207-BFLF2 VL (*2)	EBV BFLF2 (As. 1-318)	Laborkollektion
pDONR207-BFRF1 Δ TMD (*2)	EBV BFRF1 (As.1-317)	Laborkollektion
pDONR207-KSHVOrf67 VL (*2)	KSHV Orf 67 (As. 1-272)	Laborkollektion
pDONR207- KSHVOrf69 VL (*2)	KSHV Orf 69 (As. 1-303)	Laborkollektion

(*1) LR-Reaktion in Hefevektor pGADT7-DEST

(*2) LR-Reaktion in Hefevektor pGBKT7-DEST

(*3) LR-Reaktion in Expressionsvektor pCR3-N-*c-myc*

(*4) LR-Reaktion in Expressionsvektor pTRES

(*5) LR-Reaktion in Expressionsvektor pcDNA3-Rluc

3.1.8.3. Expressionsvektoren

Tabelle 3.13: Verwendete Expressionsvektoren

Nr.	Vektor	Klonierungsstrategie	Herkunft
1	pEXPR-IBA5-UL34 (*)	PCR: Oligos Nr.5/6, <i>Template</i> pHSV-1(17 ⁺)lox (*1)	diese Studie
2	pEXPR-IBA5-UL34s272 (*)	PCR: Oligos Nr.5/7, <i>Template</i> pHSV-1(17 ⁺)lox (*1)	diese Studie
3	pEXPR-IBA5-UL34s269 (*)	PCR: Oligos Nr.5/8, <i>Template</i> pHSV-1(17 ⁺)lox (*1)	diese Studie
4	pEXPR-IBA5-UL34s267	PCR: Oligos Nr.43/44, <i>Template</i> Nr.1	diese Studie
5	pEXPR-IBA5-UL34s265	PCR: Oligos Nr.45/46, <i>Template</i> Nr.1	diese Studie
6	pEXPR-IBA5-UL34s263 (*)	PCR: Oligos Nr.5/9, <i>Template</i> pHSV-1(17 ⁺)lox (*1)	diese Studie

Nr.	Vektor	Klonierungsstrategie	Herkunft
7	pEXPR-IBA5-UL34s260 (*)	PCR: Oligos Nr.5/10, <i>Template</i> pHSV-1(17 ⁺)lox (*1)	diese Studie
8	pEXPR-IBA5-UL34s256 (*)	PCR: Oligos Nr.5/11, <i>Template</i> pHSV-1(17 ⁺)lox (*1)	diese Studie
9	pcDNA3-StrepUL34-UL50tail (**)	PCR: Oligos Nr.12/13, <i>Template</i> Nr.1 (*2); PCR: Oligos Nr.14/15, <i>Template</i> pDONR207-UL50 (U. Koszinowski) (*3)	diese Studie
10	pcDNA3-StrepUL34-BFRF1tail (**)	PCR: Oligos Nr.12/13, <i>Template</i> Nr.1 (*2); PCR: Oligos Nr.16/17, <i>Template</i> pGADT7-BFRF1 (Laborkollektion) (*3)	diese Studie
11	pcDNA3-StrepUL34-UL56tail (**)	PCR: Oligos Nr.12/13, <i>Template</i> Nr.1 (*2); PCR: Oligos Nr.18/19, <i>Template</i> pGBKT7-UL56 (Laborkollektion) (*3)	diese Studie
12	pcDNA3-StrepUL34-U9tail (**)	PCR: Oligos Nr.12/13, <i>Template</i> Nr.1 (*2); PCR: Oligos Nr.20/21, <i>Template</i> pGBKT7-U9 (Laborkollektion) (*3)	diese Studie
13	pcDNA3-StrepUL34-Bcl2tail (**)	PCR: Oligos Nr.12/13, <i>Template</i> Nr.1 (*2); PCR: Oligos Nr.22/23, <i>Template</i> pcDNA3-Bcl2 (C.Völzing) (*3)	diese Studie
14	pcDNA3-StrepUL34-Vamp2tail (**)	PCR: Oligos Nr.12/13, <i>Template</i> Nr.1 (*2); PCR: Oligos Nr.24/25, <i>Template</i> pSFV1-Vamp2 (U. Matti) (*3)	diese Studie

(*) Ligation (*Xho*//*EcoRV*-geschnittener Vektor pEXPR-IBA5, Insert: *Xho*//*EcoRV*-geschnittenes Fragment (*1))

(**) *Triple*-Ligation (*HindIII*//*EcoRV*-geschnittener Vektor pcDNA3, Insert 1: *HindIII*//*AgeI*-geschnittenes Fragment (*2) und Insert 2: *AgeI*//*EcoRV*-geschnittenes Fragment (*3))

3.1.8.4. Klonierungsvektoren

Tabelle 3.14: Verwendete Klonierungsvektoren

Nr.	Vektor	Klonierungsstrategie	Herkunft
15	pBS-UL34-BAC	PCR: Oligos Nr.26/27, <i>Template</i> pLoCMV-VP1/3 (C.H. Nagel)	Laborkollektion
16	pBS-UL34 BAC (<i>SfcI</i>)	PCR: Oligos Nr.47/48, <i>Template</i> Nr.15	diese Studie
17	pBS-UL34s269 (*)	PCR: Oligos Nr.28/29, <i>Template</i> Nr.1 (*1)	diese Studie
18	pBS-UL34s267 (*)	PCR: Oligos Nr.28/30, <i>Template</i> Nr.1 (*1)	diese Studie
19	pBS-UL34s265 (*)	PCR: Oligos Nr.28/31, <i>Template</i> Nr.1 (*1)	diese Studie
20	pBS-UL34s251 (*)	PCR: Oligos Nr.28/32, <i>Template</i> Nr.1 (*1)	diese Studie
21	pBS-UL34-UL50tail (*)	PCR: Oligos Nr.28/33, <i>Template</i> Nr.9 (*1)	diese Studie
22	pBS-UL34-BFRF1tail (*)	PCR: Oligos Nr.28/34, <i>Template</i> Nr.10 (*1)	diese Studie
23	pBS-UL34-UL56tail (*)	PCR: Oligos Nr.28/35, <i>Template</i> Nr.11 (*1)	diese Studie
24	pBS-UL34-US9tail (*)	PCR: Oligos Nr.28/36, <i>Template</i> Nr.12 (*1)	diese Studie
25	pBS-UL34-Bcl2tail (*)	PCR: Oligos Nr.28/37, <i>Template</i> Nr.13 (*1)	diese Studie
26	pBS-UL34-Vamp2tail (*)	PCR: Oligos Nr.28/38, <i>Template</i> Nr.14 (*1)	diese Studie
27	pBS-UL34-PrelaA (*)	1.PCR: Oligos Nr.28/39; 2.PCR: Oligos Nr.28/40, <i>Template</i> Nr.1 (*1)	diese Studie
28	pBS-UL34Δ236-251 (**)	PCR: Oligos Nr.28/42, <i>Template</i> Nr.15 (*2); PCR: Oligos Nr.41/27, <i>Template</i> Nr.15 (*3)	diese Studie
29	pBS-UL34NLSmt	PCR: Oligos Nr.49/50, <i>Template</i> Nr.15	diese Studie

(*) *Triple*-Ligation (*NcoI*//*BstBI*-geschnittener Vektor pBS-UL34-BAC, Insert 1: *NcoI*//*SfcI*-geschnittenes Fragment (*1) und Insert 2: 556 bp-Fragment erhalten aus *SfcI*//*BstBI*-Verdau von pBS-UL34 BAC (*SfcI*)

(**) *Triple*-Ligation (*NcoI*//*BstBI*-geschnittener Vektor pBS-UL34-BAC, Insert 1: *NcoI*//*SpeI*-geschnittenes Fragment (*2) und Insert 2: *SpeI*//*BstBI*-geschnittenes Fragment (*3))

3.1.8.5. HSV-1 BAC

Tabelle 3.15: Verwendete HSV-1 BAC

Nr.	generierte BAC Mutante	inseriertes Fragment	Ausgangs-BAC
30	pHSV-1(17 ⁺)lox Δ UL34/ <i>gk</i>	<i>galK</i> -kan in UL34 Lokus (bp 1-825) (PCR: Oligos Nr.55/56, <i>Template</i> pGPS- <i>galK</i> -kan (Z. Ruzsics))	pHSV-1(17 ⁺)lox
31	pHSV-1(17 ⁺)lox UL34 wt (<i>rescue</i>)	UL34 wt (<i>Xba</i> II/ <i>Bst</i> BI-Fragment von <i>Template</i> Nr.16)	BAC-Nr.30
32	pHSV-1(17 ⁺)lox UL34s269	UL34s269 (<i>Xba</i> II/ <i>Bst</i> BI-Fragment von <i>Template</i> Nr.17)	BAC-Nr.30
33	pHSV-1(17 ⁺)lox UL34s267	UL34s267 (<i>Xba</i> II/ <i>Bst</i> BI-Fragment von <i>Template</i> Nr.18)	BAC-Nr.30
34	pHSV-1(17 ⁺)lox UL34s265	UL34s265 (<i>Xba</i> II/ <i>Bst</i> BI-Fragment von <i>Template</i> Nr.19)	BAC-Nr.30
35	pHSV-1(17 ⁺)lox UL34s251	UL34s251 (<i>Xba</i> II/ <i>Bst</i> BI-Fragment von <i>Template</i> Nr.29)	BAC-Nr.30
36	pHSV-1(17 ⁺)lox UL34-UL50tail (HCMV)	UL34-UL50tail (<i>Xba</i> II/ <i>Bst</i> BI-Fragment von <i>Template</i> Nr.21)	BAC-Nr.30
37	pHSV-1(17 ⁺)lox UL34-BFRF1tail (EBV)	UL34-BFRF1tail (<i>Xba</i> II/ <i>Bst</i> BI-Fragment von <i>Template</i> Nr.22)	BAC-Nr.30
38	pHSV-1(17 ⁺)lox UL34-UL56tail	UL34-UL56tail (<i>Xba</i> II/ <i>Bst</i> BI-Fragment von <i>Template</i> Nr.23)	BAC-Nr.30
39	pHSV-1(17 ⁺)lox UL34-U _s 9tail	UL34-U _s 9tail (<i>Xba</i> II/ <i>Bst</i> BI-Fragment von <i>Template</i> Nr.24)	BAC-Nr.30
40	pHSV-1(17 ⁺)lox UL34-Bcl2tail	UL34-Bcl2tail (<i>Xba</i> II/ <i>Bst</i> BI-Fragment von <i>Template</i> Nr.25)	BAC-Nr.30
41	pHSV-1(17 ⁺)lox UL34-Vamp2tail	UL34-Vamp2tail (<i>Xba</i> II/ <i>Bst</i> BI-Fragment von <i>Template</i> Nr.26)	BAC-Nr.30
42	pHSV-1(17 ⁺)lox UL34-PrelaA	UL34-PrelaminA tail (<i>Xba</i> II/ <i>Bst</i> BI-Fragment von <i>Template</i> Nr.27)	BAC-Nr.30
43	pHSV-1(17 ⁺)lox UL34 Δ 236-251	UL34 Δ 236-251 (<i>Xba</i> II/ <i>Bst</i> BI-Fragment von <i>Template</i> Nr.28)	BAC-Nr.30
44	pHSV-1(17 ⁺)lox UL34NLSmt	UL34NLSmt (<i>Xba</i> II/ <i>Bst</i> BI-Fragment von <i>Template</i> Nr.29)	BAC-Nr.30
45	pHSV-1(17 ⁺)lox Δ UL31/ <i>gk</i>	<i>galK</i> -kan in UL31 Lokus (bp 9-865) (PCR: Oligos Nr.57/58, <i>Template</i> pGPS- <i>galK</i> -kan (Z. Ruzsics))	pHSV-1(17 ⁺)lox
46	pHSV-1(17 ⁺)lox UL31wt (<i>rescue</i>)	UL31wt (PCR: Oligos Nr.60/61, <i>Template</i> pHSV-1(17 ⁺)lox)	BAC-Nr.45
47	pHSV-1(17 ⁺)lox UL31NLSmt	UL31NLSmt (PCR: Oligos Nr.60/61, <i>Template</i> pDNOR207-UL31NLSmt3)	BAC-Nr.45
48	pHSV-1(17 ⁺)lox SV40NLS-UL31NLSmt	SV40NLS-UL31NLSmt (PCR: Oligos Nr.60/62, <i>Template</i> pCR3-N-c-myc-SV40NLS-UL31NLSmt (V. Raschbichler))	BAC-Nr.45
49	pHSV-1(17 ⁺)lox Δ UL31NLSmt/ <i>gk</i>	<i>galK</i> -kan in UL31NLSmt Lokus (PCR: Oligos Nr.57/58, <i>Template</i> pGPS- <i>galK</i> -kan (Z. Ruzsics))	BAC-Nr.47
50	pHSV-1(17 ⁺)lox UL31NLSmt <i>revertant</i>	UL31wt (PCR: Oligos Nr.60/61, <i>Template</i> pHSV-1(17 ⁺)lox)	BAC-Nr.49
51	pHSV-1(17 ⁺)lox Δ SV40NLS-UL31NLSmt/ <i>gk</i>	<i>galK</i> -kan in SV40NLS-UL31NLSmt Lokus (PCR: Oligos Nr.57/59, <i>Template</i> pGPS- <i>galK</i> -kan (Z. Ruzsics))	BAC-Nr.48
52	pHSV-1(17 ⁺)lox SV40NLS-UL31NLSmt <i>revertant</i>	UL31wt (PCR: Oligos Nr.60/63, <i>Template</i> pHSV-1(17 ⁺)lox)	BAC-Nr.51
53	pHSV-1(17 ⁺)lox Δ UL31/ <i>gk</i> -UL34NLSmt	<i>galK</i> -kan in UL31 Lokus (bp 9-865) (PCR: Nr.57/58, <i>Template</i> pGPS- <i>galK</i> -kan (Z. Ruzsics))	BAC-Nr.44
54	pHSV-1(17 ⁺)lox UL31NLSmt-UL34NLSmt	UL31NLSmt (PCR: Oligos Nr.60/61, <i>Template</i> pDNOR207-UL31NLSmt3)	BAC-Nr.53

3.1.9. Bakterienstämme

Tabelle 3.16: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
DH5 α	F ϕ 80dlacZM15 (lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(r k , m k) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ ⁻	Invitrogen, Karlsruhe, D
DH10B	F ϕ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 endA1 araD139 Δ (ara, leu)7697 galU galK λ ⁻ rpsL nupG	Invitrogen, Karlsruhe, D
SW102	DH10B [λ c1857 (cro-bioA)<->Tet] Δ galK gal ⁺	Warming <i>et al.</i> , 2005
XL-1 blue	endA1 supE44 thi-1 hsdR17 gyrA96 relA1 lac [F ⁺ proAB lacIqZ Δ M15 Tn10 (Tetr)]	Stratagene, La Jolla, USA

3.1.10. Hefestämme

Tabelle 3.17: Verwendete Hefestämme

Stamm	Genotyp	Reporter	Transformations- marker	Referenz
AH109	MATα , <i>trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2 URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ, MEL1</i>	<i>HIS3, ADE2, MEL1, lacZ</i>	<i>trp1, leu2</i>	Clontech, Mountain View, USA
Y187	MATα , <i>ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4Δ, gal80Δ, met-, URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ MEL1</i>	<i>MEL1, lacZ</i>	<i>trp1, leu2</i>	Clontech, Mountain View, USA

3.1.11. Säugerzelllinien

Tabelle 3.18: Verwendete Säugerzelllinien

Zelllinie	Herkunft	Morphologie	Referenz
HEK 293	humane embryonale Nierenzellen	epithelial, Monolayer	ATCC-Nr. CCL-1573
Hela	humane Cervix-Karzinom-Zellen	epithelial, Monolayer	ATCC-Nr. CCL-2
Hep2	humane Larynx-Karzinom-Zellen	epithelial, Monolayer	ATCC-Nr. CCL-23
Vero	Nierenzellen der grünen Meerkatze (<i>Cercopithecus aethiops</i>)	fibroblastenähnlich, Monolayer	ATCC-Nr. CCL-81
UL31-RSC	<i>Rabbit skin cell</i> , welche UL31 konstitutiv exprimieren (Klon 7)	epithelial, Monolayer	(Liang <i>et al.</i> , 2004)

3.1.12. Viren

Tabelle 3.19: Verwendete Viren

Stamm	Charakteristika	Referenz
HSV-1 (F)	Wildtyp-Virus	B. Roizman, Chicago, USA
HSV-1 (17 ⁺)	Wildtyp-Virus, vollständig sequenziert (GenBank Nr. NC_001806)	J. Subak-Sharpe, Glasgow, UK
HSV-1 (17 ⁺)lox	Δ UL23, <i>loxP</i> -Stelle (aufgrund von Insertion der BAC-Gene), <i>oriL⁻</i>	B. Sodeik, Hannover, D
HSV-1 (17 ⁺)blueLox-GFPVP26	Δ UL23, <i>loxP</i> -Stelle (aufgrund von Insertion der BAC-Gene), <i>oriL⁻, <i>lacZ</i>, GFPVP26</i>	(Nagel <i>et al.</i> , 2008)

HSV-1 Virusmutanten, welche im Verlauf dieser Arbeit basierend auf dem HSV-1 (17⁺)lox BAC hergestellt wurden, sind in Tabelle 3.15 zusammengefasst und in den Ergebnissen beschrieben.

3.2. Methoden

3.2.1. Bakterienkultur

3.2.1.1. Kultivierung von Bakterien

Escherichia coli (*E. coli*) Bakterien wurden in LB-Medium oder auf LB-Agarplatten kultiviert. Die Inkubation der *E. coli* Stämme DH5 α und XL-1 blue erfolgte aerob bei 37°C und, im Fall von Flüssigkulturen, unter konstantem Schütteln. Die *E. coli* Stämme DH10B und SW102 wurden bei 32°C kultiviert.

<u>LB-Medium (1 l):</u>	10 g	Bacto Trypton
	5 g	Bacto Hefeextrakt
	4 g	NaCl
LB-Agar:	LB-Medium mit 1,5% (w/v) Agar-Agar	

Abhängig von den Selektionsgenen der Plasmide wurden folgende Antibiotika zugesetzt:

Ampicillin	100 μ g/ml
Chloramphenicol	25 μ g/ml
Gentamycin	15 μ g/ml
Kanamycin	50 μ g/ml
Spectinomycin	50 μ g/ml

Für die Herstellung von Glycerin-Dauerkulturen wurden 600 μ l Übernachtskultur mit 200 μ l Glycerin (60%) versetzt und anschließend bei -80°C gelagert.

3.2.1.2. Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien

Zur Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien wurde ein Einzelklon in 20 ml TYM-Medium transferiert und bis zu einer optischen Dichte (OD_{600nm}) von 0,8 bei 37°C inkubiert. Die Bakterienkultur wurde mit 100 ml Medium verdünnt und wiederum bei einer Temperatur von 37°C bis zu einer OD_{600nm} von 0,8 inkubiert. Nach erneuter Verdünnung mit 400 ml TYM-Medium wurde die Kultur bis zu einer OD_{600nm} von 0,6 bei 37°C inkubiert und anschließend auf Eiswasser abgekühlt. Alle weiteren Schritte erfolgten bei 4°C. Die Bakterien wurden zuerst in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und bei 2.500 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in 25 ml kaltem TfB I-Puffer resuspendiert. Nach 45-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterien bei 2.000 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets schließlich in 25 ml kaltem TfB II-Puffer aufgenommen, aliquotiert, kurz in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

<u>TYM-Medium (1 l):</u>	10 mM	MgSO ₄
	100 mM	NaCl
	20 g	Bacto Trypton
	5 g	Bacto Hefeextrakt

<u>TfB I-Puffer:</u>	30 mM	KAc
	50 mM	MnCl ₂
	100 mM	KCl
	10 mM	CaCl
	15% (v/v)	Glyzerin
<u>TfB II-Puffer:</u>	10 mM	MOPS, pH 7
	75 mM	CaCl
	10 mM	KCl
	15% (v/v)	Glyzerin

3.2.1.3. Transformation chemisch-kompetenter Bakterien

100 µl chemisch-kompetente Bakterien wurden mit 200-400 ng Plasmid-DNA oder einem kompletten Ligations- bzw. Rekombinationsansatz gemischt und zunächst für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (1 min bei 42°C) wurde der Ansatz kurz auf Eis abgekühlt und in 500 µl frischem LB-Medium für 1 h bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien auf die entsprechenden LB-Agarplatten mit dem geeigneten Antibiotikum ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

3.2.1.4. Herstellung elektro- und rekombinations-kompetenter Bakterien

Für die Herstellung elektro-kompetenter *E. coli* SW102 Bakterien wurden 200 ml LB-Medium mit 2 ml einer 5 ml Übernachtskultur inokuliert und bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 bei 32°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien kurz auf Eis abgekühlt, in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und mit 3.500 x g bei 4°C für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in 50 ml eiskaltem, autoklaviertem Wasser resuspendiert und erneut bei 3.500 x g bei 4°C für 5 min zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde einmal wiederholt und zuletzt das Bakterienpellet in 100 µl eiskaltem Wasser aufgenommen und bis zur Elektroporation auf Eis gehalten. Für die Präparation rekombinations-kompetenter *E. coli* SW102 Bakterien wurden nach Erreichen der gewünschten OD_{600nm} von 0,5 die im bakteriellen Genom integrierten Rekombinationsgene durch eine 15-minütige Schüttelinkubation bei 42°C im Wasserbad zusätzlich aktiviert. Die weitere Präparation erfolgte wie oben beschrieben.

3.2.1.5. Transformation elektro- und rekombinations-kompetenter Bakterien

Die zu transformierende DNA (200 ng) wurde mit 70 µl elektro- und rekombinations-kompetenten Bakterien gemischt und in eine vorgekühlte 2 mm-Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation wurde bei 2500 V, 25 µF und 200 Ω durchgeführt. Anschließend wurden die Bakterien in 1 ml LB-Medium überführt, 1 h bei 32°C unter Schütteln inkubiert und zur Selektion auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und 24 h bei 32°C inkubiert.

3.2.2. Hefekultur

3.2.2.1. Kultivierung von Hefen

Als Nährmedium von *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) wurde YPD-Medium verwendet. Die Kultivierung erfolgte bei 30°C auf Agarplatten oder im Schüttelinkubator.

<u>YPD-Medium (1 l):</u>	20 g	Trypton
	10 g	Bacto Hefeextrakt
	20 g	Glukose
YPD-Agar:	YPD-Medium mit 3% (w/v) Agar-Agar	

Dropout-Medien wurden für die Selektion von Plasmid-tragenden Hefezellen und für die Überprüfung der Reportergenaktivität verwendet.

<u>SD-LW (1 l):</u>	26,7 g	Minimal SD Base
	0,64 g	-Leu/-Trp DO Supplement
<u>SD-L (1 l):</u>	26,7 g	Minimal SD Base
	0,64 g	-Leu/-Trp DO Supplement
	20 mg	L-Tryptophan
<u>SD-W (1 l):</u>	26,7 g	Minimal SD Base
	0,64 g	-Leu/-Trp DO Supplement
	100 mg	L-Leucin
<u>SD-LWH (1 l):</u>	26,7 g	Minimal SD Base
	0,6 g	-Ade/-His/-Leu/-Trp DO Supplement
	20 mg	L-Adenin
Selektions-Agar:	<i>Dropout</i> -Medium mit 3% (w/v) Agar-Agar	

3.2.2.2. Herstellung chemisch-kompetenter Hefen

Jeweils 25 ml YPD-Medium wurden mit einer Vorkultur des gewünschten Hefestamms auf eine OD_{600nm} von 0,1 inokuliert und bis zum Erreichen einer OD_{600nm} von 0,6 bei 30°C inkubiert. Nach Überführung der Kultur in 50 ml Falconröhrchen wurden die Hefezellen in einer Kühlzentrifuge (5 min, 930 x g, 4°C) pelletiert, anschließend in 12,5 ml SBEG-Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Hefepellet wurde in 500 µl SBEG-Lösung aufgenommen, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

<u>SBEG-Lösung:</u>	1 M	Sorbitol
	10 mM	Bicin
	3% (v/v)	Ethylenglycol

3.2.2.3. Transformation chemisch-kompetenter Hefen

Die zu transformierende DNA (1 µg) wurde mit 100 µl chemisch-kompetenten Hefezellen des gewünschten Stamms gemischt und nach Zugabe von 750 µl PEG/Bicin-Lösung 1 h bei

30°C inkubiert. Nach einem Hitzeschock (5 min bei 45°C) wurden die Zellen für 5 min bei 2.700 x g pelletiert, mit 1 ml NB-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Zuletzt wurden 800 µl des Überstandes verworfen, die Hefezellen im restlichen NB-Puffer resuspendiert, auf Selektions-Agarplatten mit entsprechendem *Dropout*-Medium ausgestrichen und 3 Tage bei 30°C inkubiert.

<u>PEG/Bicin-Lösung:</u>	40% (w/v)	PEG 1000
	200 mM	Bicin, pH 8,35
<u>NB-Puffer:</u>	150 mM	NaCl
	10 mM	Bicin, pH 8,35

3.2.3. Zellkultur

3.2.3.1. Kultivierung eukaryotischer Zellen

Hela, Hep2 sowie Vero und UL31-RSC Zellen wurden in *Dulbecco's modified Eagle Medium* (DMEM) bei 37°C und 5% CO₂ in feuchter Atmosphäre kultiviert. Supplementiert wurde das Medium mit 10% fötalem Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Zum Passagieren der konfluenten Zellkulturen wurde das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen, mit 1x Trypsin/EDTA (0,5%) abgelöst, in frischem Medium resuspendiert und auf neue Zellkulturschalen verteilt.

3.2.3.2. Dauerkultur eukaryotischer Zellen

Für die Kryo-Konservierung wurden die Zellen einer konfluenten 10 cm-Zellkulturschale zuerst bei 300 x g für 5 min zentrifugiert und das Pellet in 0,5 ml eiskaltem DMEM mit 40% FCS resuspendiert. Als nächstes wurde unter leichtem Schwenken tropfenweise 0,5 ml DMEM mit 20% DMSO zugegeben und die Zellen sofort in ein eisgekühltes Kryo-Röhrchen überführt und bei -80°C für 24 h zwischengelagert. Die Lagerung der Säugerzellen über einen längeren Zeitraum erfolgte in Flüssigstickstoff. Zum Auftauen wurde die tiefgefrorene Zellsuspension in einem 37°C warmen Wasserbad unter leichtem Schwenken erwärmt, einmal mit dem 10-fachen Volumen Kulturmedium gewaschen und anschließend in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und in eine Zellkulturschale überführt.

3.2.3.3. Transfektion eukaryotischer Zellen

3.2.3.3.1. Transfektion von Plasmid bzw. BAC DNA

Für die Transfektion von Hela und Hep2 Zellen mit Plasmid DNA wurde das Effectene Transfektionsreagenz (Qiagen) nach Angaben des Herstellers verwendet. Zur Transfektion von Vero Zellen mit BAC DNA wurde Lipofectamin 2000 (Invitrogen) ebenfalls nach Angaben des Herstellers benutzt. Im Fall einer Rekonstitution von rekombinanten Viren aus BAC DNA wurden Vero Zellen in 6-well Platten bis zum Auftreten von *Plaques* - hervorgerufen durch das replizierende Virus - kultiviert. Bei vollständigem zytopathischem Effekt (*cytopathic*

effect, CPE) wurde der Überstand (Passage 1, P1) in ein Kryo-Röhrchen überführt, Zelltrümmer für 10 min mit 850 x g abzentrifugiert und bei -80°C zunächst gelagert. Die Virussuspension wurde für die Infektion von neuen Zellen benutzt.

3.2.3.3.2. Transfektion von siRNA

Durch die Transfektion von Säugerzellen mit kurzen, chemisch synthetisierten dsRNA-Molekülen (*small interfering RNA*, siRNA) kann durch RNA Interferenz die Expression von spezifischen Zielgenen verringert werden (*Silencing*). Dabei wird die siRNA in den Proteinkomplex RISC (*RNA induced silencing complex*) eingebaut, der dadurch komplementär an die Ziel-mRNA bindet und nach mehreren Schritten diese entwindet und spaltet. Die Folge ist schließlich der Abbau der mRNA des Zielgens. Zum *Silencing* von PLSCR1 bzw. Asna1 wurden jeweils vier verschiedene 19 Nukleotid lange doppelsträngige siRNA von der Firma Dharmacon chemisch synthetisiert und diese in gleichen Mengen gemischt (*SMARTpool*). Parallel zum spezifischen siRNA *Pool* wurde eine Kontroll- (*ctrl*-) siRNA verwendet, die keine komplementäre Zielsequenz im Hela-Genom besitzt. Die Transfektion von siRNA wurde in der Regel mit Hela Zellen in *12-well* Platten durchgeführt. Zur Bildung der Transfektionskomplexe wurde zuerst separat 1 µl der siRNA (entspricht 20 nM) in 150 µl HBSS und 1,5 µl DharmaFECT 1 Transfektionsreagenz (Dharmacon) in 150 µl HBSS verdünnt, anschließend in einer *12-well* Vertiefung gemischt und 20 min bei RT zusammen inkubiert. Zwischenzeitlich wurden Hela Zellen in DMEM/F12 (1:1) mit 5% FCS zu einer Konzentration von 2×10^5 Zellen/ml aufgenommen und davon am Ende 700 µl pro *12-well* Vertiefung zu den Transfektionskomplexen gegeben und unter Standardbedingungen 48 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen je nach Fragestellung weiter behandelt (unbehandelt, Plasmid Transfektion, HSV-1 Infektion). Für Immunfluoreszenz-Analysen wurden zusätzlich Deckgläschen ausgelegt. Ebenso wurden 48 h nach siRNA-Behandlung Zelllysate hergestellt, um den *Silencing* Erfolg mittels SDS-PAGE und Immunoblot überprüfen zu können. Die Transfektion von siRNA in *6-well* Platten wurde analog durchgeführt, wobei die einzusetzenden Mengen von siRNA, Transfektionsreagenz, Medien und Zellen im Verhältnis zu der größeren Zellkulturfläche pro Vertiefung berechnet wurden.

3.2.4. Virologische Methoden

3.2.4.1. Herstellung von Virusstocks

Zur Präparation von Virusstocks wurden subkonfluente Vero Zellen in 15 cm-Zellkulturschalen mit der jeweiligen Virussuspension und einer MOI von 0,02 infiziert. Die Zellen wurden bis zum Erreichen eines fast vollständigen CPE inkubiert (3-4 Tage) und anschließend der Überstand geerntet, bei -80°C gefroren und erneut aufgetaut. Dies diente dazu, die noch vorhandenen Zellen aufzubrechen und zusätzlich intrazelluläre Viruspartikel

zu gewinnen. Zuletzt wurden Zelltrümmer für 10 min mit 850 x g sedimentiert, der virushaltige Überstand abschließend in Kryo-Röhrchen überführt und bei -80°C gelagert.

3.2.4.2. Virusinfektion eukaryotischer Zellen

Wenn nicht anders beschrieben, wurden subkonfluente Kulturen der entsprechenden Zellen mit dem gewünschten HSV-1 Virus inokuliert bzw. zur Kontrolle mit virusfreiem Medium versetzt (*mock*) und 1h bei 37°C und 5% CO₂ unter gelegentlichem Bewegen inkubiert. Anschließend wurde das Infektionsmedium abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen, um alle nicht-adsorbierten Viruspartikel zu entfernen und mit frischem Zellkulturmedium bis zur weiteren Analyse unter Standardbedingungen inkubiert. Das Maß für die Anzahl der zur Infektion verwendeten infektiösen Viruspartikel ist die sogenannte *multiplicity of infection* (MOI), welche die Zahl infektiöser Partikel pro Zelle angibt.

3.2.4.3. Plaque Assay

Die Menge infektiöser Viruspartikel in einer Probe wurde mit Hilfe des sogenannten *Plaque Assay* bestimmt. Vero Zellen wurden in *24-well* Platten mit 8×10^4 Zellen pro Vertiefung ausgesät. Am folgenden Tag wurden die subkonfluenten Zellen mit 400 µl Virusinokulum infiziert. Dazu wurde eine 10-fach Verdünnungsreihe der virushaltigen Probe in DMEM hergestellt und in Triplikaten mit den Vero Zellen 1h unter Standardbedingungen inkubiert. Nach Entfernen des Inokulums wurden die Zellen mit Methylcellulose-haltigem Medium überschichtet und weiter inkubiert. Die Methylcellulose bewirkt, dass sich die Infektion ausschließlich von Zelle zu Zelle verbreitet und damit der resultierende *Plaque* auf jeweils eine infizierte Zelle zurückgeht. 3 Tage nach der Infektion wurden die Zellen mit Kristallviolett-Lösung fixiert und gleichzeitig gefärbt. Schließlich wurden die entstandenen *Plaques* gezählt und der Virustiter der Probe, welcher in *plaque forming units* (pfu) pro ml angegeben wird, wie folgt berechnet:

Virustiter (pfu/ml) = Mittelwert *Plaquantzahl* x Verdünnungsfaktor / Inokulumvolumen

<u>Methylcellulose-Medium (0,5 l):</u>	3,75 g	Carboxymethylcellulose
	25 ml	FCS
	50 ml	10x MEM
	5 ml	L-Glutamin-Lösung
	2,5 ml	100x Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA)
	5 ml	100x Penicillin/Streptomycin-Lösung
	24,7 ml	NaHCO ₃ (7,5%)
<u>Kristallviolett-Lösung:</u>	0,2% (w/v)	Kristallviolett
	11% (v/v)	Formaldehyd
	2% (v/v)	Ethanol
	2% (w/v)	Paraformaldehyd

3.2.4.4. Wachstumskinetik

Um die viralen Wachstumseigenschaften zu charakterisieren, wurden die entsprechenden Zellen in *12-well* Platten subkonfluent ausgesät und mit den entsprechenden Virusstocks und einer MOI von 0,1 infiziert. Anschließend wurde in regelmäßigen Intervallen jeweils der Kulturüberstand eines *12-wells* (zur Bestimmung der gebildeten extrazellulären Viruspartikel) sowie die infizierten Zellen in gleichem Volumen Medium (zur Bestimmung intrazellulärer Virionen) aufgenommen und bei -80°C tiefgefroren. Durch mehrmaliges Auftauen im Wasserbad (37°C) und erneutes Einfrieren in Flüssigstickstoff wurden die infizierten Zellen aufgebrochen und somit die intrazellulären Viren freigesetzt. Vorhandene Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation für 1 min mit 10.000 x g entfernt und schließlich der Virustiter von allen Proben mittels *Plaque Assay* (siehe Abschnitt 3.2.4.3) bestimmt.

3.2.4.5. Echtzeit-PCR-Quantifizierung von viralem Genom (*realtime qPCR*)

Virale DNA wurde aus 200 µl Probe von HSV-1 infizierten Zellen mit Hilfe des High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche) nach Angaben des Herstellers in einem Volumen von 50 µl extrahiert und mittels Echtzeit-PCR-Quantifizierung (*realtime quantitative PCR*) untersucht. Die TaqMan™-PCR wurde im ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) mit HSV-1 spezifischen Primern und Sonden durchgeführt und mit der ABI Prism 7000 Software (Applied Biosystems) analysiert. Zusätzlich wurde ein HSV-1 Standard (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Klinischen Virologie, Max von Pettenkofer-Institut, LMU München) mitgeführt. Somit konnte aus der definierten Standardgerade die Anzahl der viralen Genomkopien pro ml in den jeweiligen Proben unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren berechnet werden.

<u>Reaktionsansatz:</u>	5 µl	virale DNA
	0,9 µl	HSV-1 Primer 1
	0,9 µl	HSV-1 Primer 2
	0,9 µl	HSV1 Sonde
	15 µl	TaqMan Gene Expression Master Mix
	7,3 µl	Ampuwa

<u>TaqMan™-PCR-Programm:</u>	50°C	2 min	
	95°C	10 min	
	95°C	15 s	} 45 x
	60°C	1 min	

3.2.4.6. Echtzeit-PCR-Quantifizierung von viralen RNA-Transkripten mittels TaqMan-PCR

Die Gesamt-RNA aus infizierten und siRNA-behandelten Hela Zellen eines *12-wells* wurde mittels Trizol-Reagenz (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers in einem Volumen von 20 µl RNase-freiem Wasser isoliert. Die Umschreibung in cDNA erfolgte mittels SuperScript™ II

Reverse Transkriptase (Invitrogen) ebenfalls nach Angaben des Herstellers. Dabei wurden jeweils 1 µg RNA und 250 ng Hexanukleotid Random-Primer-Mix (Promega) eingesetzt. Die Analyse der RNA-Transkripte erfolgte mittels Echtzeit-PCR-Quantifizierung. Mit Hilfe der Software *Assay Design Center* (www.universalprobelibrary.com) der Firma Roche wurde dabei für jedes untersuchte Gen eine optimale Kombination aus Sonde und spezifischen Oligonukleotiden entwickelt. Die verwendeten TaqMan™-Sonden wurden aus der *Universal Probe Library* (Roche) entnommen. Die TaqMan™-PCR wurde im ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) mit den folgenden Parametern durchgeführt:

<u>Reaktionsansatz:</u>	5 µl	cDNA	
	2 µl	10µM RT_Primer for	
	2 µl	10µM RT_Primer rev	
	0,25 µl	TaqMan Sonde	
	12,5 µl	TaqMan Universal Master Mix	
	0,5 µl	ROX Referenzfarbstoff	
	7,75 µl	Ampuwa	
<u>TaqMan™-PCR-Programm:</u>	94°C	12 min	} 45 x
	95°C	20 s	
	60°C	1 min	

Das Fluoreszenzsignal wurde dabei nach jedem Zyklus gemessen. Die Analyse der Daten erfolgte mit der ABI Prism 7000 Software (Applied Biosystems), indem für jede Reaktion ein C_t -Wert berechnet wurde. Um die Transkriptmenge eines gegebenen Gens in unterschiedlichen Bedingungen vergleichen zu können, wurde pro C_t -Wert von einer Verdopplung der Transkriptmenge ausgegangen. Der Mengenfaktor x kann demnach durch die Formel $x = 2^{-\Delta C_t}$ angenähert werden.

3.2.5. Molekularbiologische Methoden

3.2.5.1. Präparation von Plasmid DNA (*Mini-Präp.*)

Plasmid DNA aus *E. coli* Bakterien wurde mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) nach der Anleitung des Herstellers isoliert. Die DNA Isolierung basiert dabei auf der alkalischen Lyse der Bakterien, gefolgt von Bindung, Reinigung und Elution der DNA an einer Silica-Matrix.

3.2.5.2. Präparation von BAC DNA (*BAC Mini-Präp.*)

Zur Isolierung von BAC DNA (*low-copy* Plasmide) aus Bakterien wurde eine 10 ml Übernachtkultur zuerst mit 2600 x g bei RT für 15 min pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 300 µl Resuspensionspuffer resuspendiert und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 300 µl Lysepuffer wurde die Suspension durch mehrfaches Invertieren vorsichtig gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Als nächstes wurden 300 µl

Neutralisationspuffer hinzugefügt, erneut gemischt und weitere 3 min bei RT inkubiert. Danach wurde 5 min bei 20.000 x g zentrifugiert und der DNA-haltige Überstand in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Roth) durch 50 x Schwenken gemischt. Die Proben wurden für 5 min, 20.000 x g bei RT zentrifugiert. Die obere (wässrige) Phase wurde in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 1 ml Isopropanol gefällt und anschließend für 10 min, 20.000 x g bei RT pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA Pellet mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen, erneut für 10 min, 20.000 x g und RT pelletiert, luftgetrocknet, in 100 µl TE-Puffer aufgenommen und 15 min bei 37°C gelöst. Die so erhaltene BAC DNA war ausreichend für zwei Restriktionsanalysen. Alle verwendeten Puffer wurden dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) entnommen.

3.2.5.3. Präparation von Plasmid und BAC DNA (*Midi-Präp.*)

Die Midi-Präparation von Plasmid DNA und BAC DNA aus Bakterien erfolgte mit dem NucleoBond Xtra Midi Kit (Macherey-Nagel) aus einer 250 ml Übernachtskultur entsprechend den Angaben des Herstellers für die Isolierung von *high copy* Plasmiden. Die isolierte Plasmid DNA wurde in 500 µl TE-Puffer, die isolierte BAC DNA in 100 µl TE-Puffer aufgenommen.

3.2.5.4. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration und Reinheit der isolierten DNA wurde mit Hilfe eines Nanodrop ND-1000 Spektrophotometers (Peqlab) bestimmt. Zur Konzentrationsbestimmung wurde dabei die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen, bei welcher das Absorptionsmaximum von DNA und RNA liegt. Da Proteine ein Absorptionsmaximum bei 280 nm aufweisen, konnte mit Hilfe des Quotienten OD_{260}/OD_{280} die Reinheit der Nukleinsäuren bestimmt werden. Dabei entspricht 1 OD_{260} 50 µg/ml dsDNA bzw. 40 µg/ml RNA, während der optimale Reinheitsquotient bei 1,8 liegt.

3.2.5.5. Restriktionsanalyse von DNA

Sequenzspezifische Spaltung von DNA zur Klonierung von DNA-Konstrukten oder zu analytischen Zwecken wurde mittels Restriktionsendonukleasen nach Herstellerangaben durchgeführt. In der Regel wurden ca. 1,5 µg Plasmid DNA bei der empfohlenen Temperatur mit 5 U Enzym 2 h lang verdaut und anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese in einem 1% TAE-Agarosegel aufgetrennt. Für die Restriktionsanalyse von BAC DNA wurde ca. 2 µg BAC DNA mit 20 U Enzym versetzt und mindestens 4 h inkubiert. Der Restriktionsansatz wurde anschließend in einem 0,8% TBE-Agarosegel aufgetrennt.

3.2.5.6. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die gezielte Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte mit der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR). Dazu wurde das HotStar High Fidelity Polymerase Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers benutzt. Nach Auftrennung mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 3.2.5.8) wurde das gewünschte DNA-Fragment aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt (siehe Abschnitt 3.2.5.9).

3.2.5.7. Zielgerichtete Mutagenese

Zur Einführung von zielgerichteten Punktmutationen oder dem Austausch weniger Basenpaaren in Plasmiden wurde das Quikchange Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene) nach Herstellerangaben verwendet. Für den Entwurf der Primer wurden die Angaben des Herstellers berücksichtigt. Die Transformation nach der Mutagenese erfolgte in hochkompetente XL-1 blue Bakterien (Stratagene).

3.2.5.8. Agarose-Gelelektrophorese

Die Molekulargewicht-abhängige Auftrennung von DNA-Fragmenten und Plasmiden wurde mittels horizontaler Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. In der Regel wurde dazu ein 1% TAE-Agarosegel mit 0,25 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die DNA-Proben wurden mit der entsprechenden Menge eines 6 x DNA-Ladepuffers (Fermentas) gemischt und elektro-phoretisch (1 x TAE-Puffer, 120 V, ca. 1 h) aufgetrennt. Die Analyse von BAC DNA erfolgte mit einem 0,8% TBE-Agarosegel (1 x TBE-Puffer, 70 V, ca. 18 h). Zum Größenvergleich wurde ein Molekulargewichtsstandard (Fermentas) benutzt. Die Visualisierung der mit Ethidiumbromid gefärbten DNA erfolgte mittels UV-Anregung (Wellenlänge $\lambda=302$ nm).

<u>1 x TAE-Puffer (1 l):</u>	4,84 g	Tris
	1,14 ml	Essigsäure
	2 ml	0,5 M EDTA pH 8

<u>1 x TBE-Puffer (1 l):</u>	10,8 g	Tris
	5,5 g	Borsäure
	4 ml	0,5 M EDTA pH 8

3.2.5.9. Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Für die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, wie z.B. nach Restriktionsverdau oder PCR, wurde das QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) verwendet. Hierfür wurden die entsprechenden Banden aus einem präparativen Agarosegel unter UV-Anregung ($\lambda=302$ nm) mit einem Skalpell ausgeschnitten und nach Anleitung des Herstellers aus dem Gel aufgereinigt. Die Elution erfolgte in einem Volumen von 30 µl. Die Aufreinigung von PCR-Produkten, die anschließend für die BAC Mutagenese verwendet wurden, erfolgte mittels QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) nach Herstellerangaben.

3.2.5.10. 5'-Dephosphorylierungsreaktion

Bei der Spaltung eines Vektors durch eine einzelne Restriktionsendonuklease entstehen zwei kompatible Enden, welche wieder miteinander ligieren können. Um diese Religation zu verhindern, wurden die 5'-Enden der linearisierten DNA mit der Antarktischen Phosphatase (NEB) nach Angaben des Herstellers dephosphoryliert. Hierzu wurde der gesamte Restriktionsansatz in 10 x Reaktionspuffer der Antarktischen Phosphatase mit 5 U Enzym versetzt und 1h bei 37°C inkubiert. Für die anschließende Reinigung des Vektors wurde der Reaktionsansatz gelelektrophoretisch aufgetrennt und aus dem Agarosegel aufgereinigt (siehe Abschnitte 3.2.5.8 und 3.2.5.9).

3.2.5.11. Ligation

Für die Insertion von DNA-Fragmenten (*Insert*) in einen Vektor wurde die T4 DNA Ligase des Quick Ligation Kits (NEB) nach Angaben des Herstellers verwendet, wobei für den Ligationsansatz dreimal mehr *Insert* als Vektor DNA eingesetzt wurde. Anschließend wurde der komplette Ligationsansatz in chemisch-kompetente DH5 α Bakterien transformiert (siehe Abschnitt 3.2.1.3).

3.2.5.12. Rekombinationsklonierung (Gateway® Klonierung)

Das Gateway®-System (Invitrogen) beruht auf dem Mechanismus von λ -Bakteriophagen, sich mittels Rekombination sequenz-spezifisch ins Wirtsgenom zu integrieren. DNA-Fragmente (*Insert*), welche mit den entsprechenden Rekombinationssequenzen (*attachment sites*, *attB1* und *attB2*) flankiert wurden, konnten mit Hilfe des BP-Clonase Mix (Invitrogen) in sogenannte *entry* Vektoren (z.B pDONR207) rekombiniert werden. Ausgehend von diesem Vektor konnte das *Insert* mit den Enzymen des LR-Clonase Mix (Invitrogen) in jeden beliebigen Zielvektor (DEST-Vektor), welcher ebenfalls spezifische Rekombinationssequenzen enthält, inseriert werden. Die Selektion erfolgt über ein toxisches Selbstmordgen (*ccdB*-Domäne) im jeweiligen Zielvektor, welches bei erfolgreicher Rekombination durch das gewünschte *Insert* ersetzt wird und so erst das Wachstum von transformierten DH5 α -Zellen ermöglicht. Die Klonierung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.2.5.13. Sequenzierung von DNA

Die Klonierung von DNA-Konstrukten wurde durch Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft. Plasmid DNA wurde von der Firma GATC Biotech AG (Konstanz, D) sequenziert sowie BAC DNA von der Firma Sequiserve (Vaterstetten, D). Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe der ApE A Plasmid Editor Software analysiert.

3.2.6. BAC Mutagenese

Die BAC Mutagenese ermöglicht eine schnelle Manipulation des herpesviralen Genoms in Bakterien, dabei können bereits etablierte und effiziente Methoden der Bakteriengenetik zu Nutze gemacht werden. B. Sodeik und Mitarbeiter klonierten das Genom des vollständig sequenzierten HSV1 Stamm 17⁺ als *bacterial artificial chromosome* (BAC) in *E. coli* (Nagel *et al.*, 2008). Dafür wurden die bakteriellen Gene der BAC Kasette zusammen mit einer eukaryotischen Cre-Rekombinase in das Gen für die Thymidinkinase UL23 integriert, welches in Zellkultur nicht essentiell ist, und mit Erkennungsstellen für die Cre-Rekombinase (*loxP*-Stellen) flankiert. Nach Transfektion des HSV-1(17⁺)*lox* BAC in eukaryotische Zellen (siehe Abschnitt 3.2.3.3.1) erfolgt die Transkription der Cre-Rekombinase, wodurch die BAC Kasette unter Verbleib einer *loxP*-Stelle aus dem Genom herausgeschnitten wird.

3.2.6.1. BAC Mutagenese mittels *galk*-kan Selektion

Die spezifische und zielgerichtete Manipulation von Genen des HSV-1(17⁺)*lox* BAC erfolgte durch homologe Rekombination mit Hilfe einer modifizierten *galk*-kan Selektionskasette. Diese besteht aus der Kombination des Galaktokinase Gens *galk* und einer Kanamycin (kan)-Resistenzkasette (Dolken *et al.*, 2010; Ott *et al.*, 2011). Die BAC Mutagenese wurde in dem von DH10B abstammenden *E. coli* Stamm SW102 durchgeführt. Dieser wird bei 32°C kultiviert und beinhaltet einen integrierten defekten, temperatur-sensitiven λ Prophagen, welcher für die homologen Rekombinationsfaktoren *gam*, *exo* and *bet* kodiert. Erst bei einem kurzzeitigen Hitzeschock der Bakterien bei 42°C werden die Rekombinationsgene schnell und in großen Mengen induziert und somit homologe Rekombination ermöglicht. Als weitere Besonderheit wurde das Galaktose Operon durch die Deletion des *galk* im SW102 Stamm modifiziert (Warming *et al.*, 2005). Die *galk* Funktion kann jedoch *in trans* komplementiert werden und dadurch die Fähigkeit, auf Galaktose als Kohlenstoff-Quelle zu wachsen, wiederhergestellt werden. Das Prinzip der *galk*-kan Selektion besteht aus zwei Schritten. Zuerst wird die *galk*-kan Kasette, flankiert mit Homologien zu einer bestimmten Zielregion, durch homologe Rekombination in das BAC inseriert. Erfolgreiche Rekombination zeigt sich in der Resistenz der rekombinanten Bakterien gegenüber Kanamycin (kan) sowie Chloramphenicol (Cam), welche durch die BAC Kasette mitgeliefert wird, und im Wachstum auf Minimalnährboden mit Galaktose als Kohlenstoffquelle. Somit wird dieser erste Schritt als positive Selektion bezeichnet. Als nächstes kann die *galk*-kan Selektionskasette durch jedes beliebige Fragment mit flankierenden Homologien zur inserierten Kasette ausgetauscht werden. Dabei wird eine negative Selektion gegen *galk* mittels 2-Deoxy-Galaktose (DOG) angewendet. Aufgrund der Phosphorylierung von DOG durch die funktionale Galaktokinase *galk* entsteht 2-Deoxy-Galaktose-1-Phosphat, ein für Bakterien

nicht verwertbares und daher toxisches Zwischenprodukt. Nur Bakterien mit erfolgreicher zweiter Rekombination sind somit resistent gegenüber DOG (Abb. 3.1).

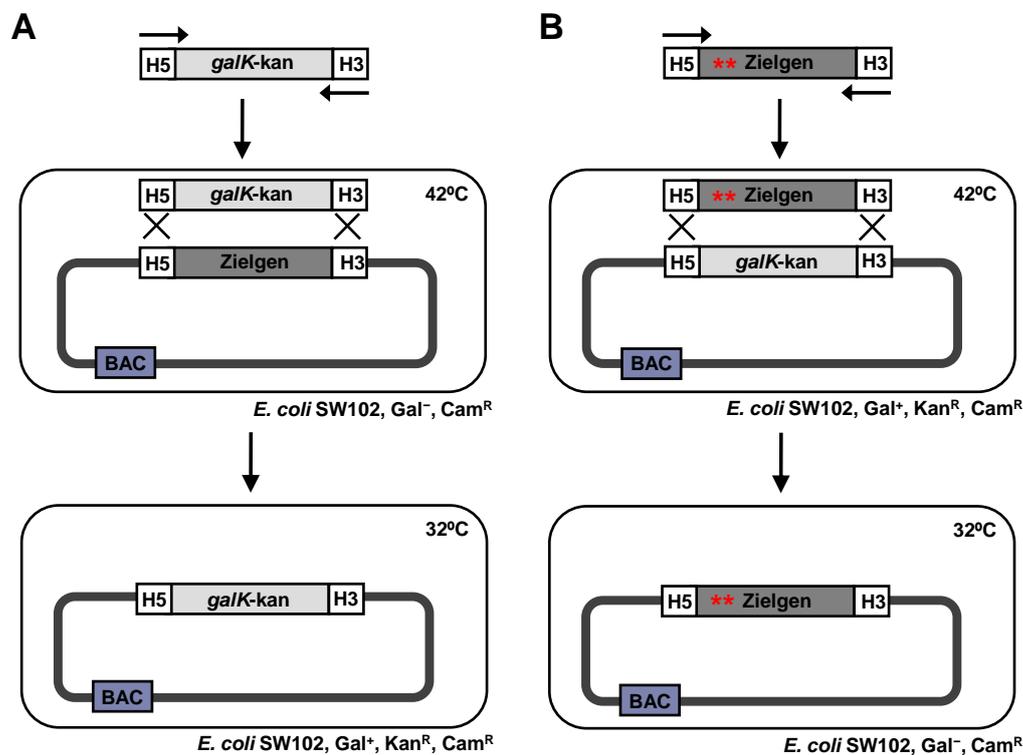


Abbildung 3.1: BAC Mutagenese mittels *galK-kan* Selektion

A) Für den ersten Schritt wird die *galK-kan* Kassetten mit flankierenden homologen Sequenzen zu einem bestimmten Zielgen im BAC mittels PCR amplifiziert und in *E. coli* SW102 transformiert. Durch Hitzeschock bei 42°C wird der integrierte temperatur-sensitive λ Prophage in *E. coli* SW102 induziert, wodurch homologe Rekombination stattfinden kann. Es folgt die positive Selektion durch Cam^R und Kan^R und Wachstum auf Minimalmedium mit Galaktose bei 32°C. **B)** Im zweiten Selektionsschritt wird die *galK-kan* Kassetten durch ein Fragment mit der gewünschten Mutation im Zielgen und den flankierenden Homologien zur inserierten Selektionskassetten ersetzt. Dies erfolgt erneut durch homologe Rekombination wie oben beschrieben. Bakterien mit rekombinantem BAC erhält man durch negative Selektion gegen *galK* auf Minimalmedium mit Glycerol und DOG bei 32°C.

3.2.6.2. Herstellung von rekombinanten HSV-1 BAC

Zur Anwendung der BAC Mutagenese mittels *galK-kan* Selektion wurde das HSV-1(17⁺) λ ox BAC zuerst aus *E. coli* DH10B durch Midi-Präparation (siehe Abschnitt 3.2.5.3) isoliert und 500 ng davon in elektro-kompetente SW102 Bakterien transformiert (siehe Abschnitt 3.2.1.5). Für die Insertion der *galK-kan* Selektionskassetten in die gewünschte Zielsequenz im HSV-1 BAC wurde im ersten Schritt mittels PCR ein *galK-kan* Fragment amplifiziert, wofür das Plasmid pGPS-*galK-kan* (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Zsolt Ruzsics, LMU München; Pubmed Nr. FR832405) verwendet wurde. Die Primer setzten sich jeweils aus zwei Bereichen zusammen, einer 50 bp Homologie am 5'-Ende, welche den flankierenden Sequenzen des Zielgens entsprachen und einer Homologie am 3'-Ende, die für die Bindung an den *galK-kan* Selektionsmarker notwendig war. Der PCR-Ansatz wurde mit *DpnI* verdaut, um das Ursprungsplasmid zu entfernen und anschließend aufgereinigt

(siehe Abschnitt 3.2.5.9). Als nächstes folgte die Transformation des *galK*-kan Fragments in elektro- und rekombinations-kompetente SW102 *E. coli* Bakterien, die den HSV-1(17⁺)lox BAC tragen (siehe Abschnitt 3.2.1.5). Die Bakterien wurden auf LB-Agarplatten mit Chloramphenicol und Kanamycin ausgestrichen und bei 32°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden Einzelkolonien auf MacConkey-Agarplatten mit 1% Galaktose ausgestrichen und für weitere zwei Tage bei 32°C inkubiert. Dieser Schritt dient zur Selektion von Bakterien mit erfolgreicher Rekombination, da aufgrund eines Farbindikators im MacConkey-Agar Bakterien, welche die vorhandene Galaktose verwerten können, als rote Kolonien wachsen. Zur Verifizierung wurde die BAC DNA von roten Kolonien isoliert (siehe Abschnitte 3.2.5.2 und 3.2.5.3) und mittels Restriktion analysiert (siehe Abschnitt 3.2.5.5). Im zweiten Schritt, der negativen Selektion, wurde die inserierte *galK*-kan Selektionskassette wieder durch ein Fragment ersetzt, das die gewünschte zu inserierende Mutation enthält und zusätzlich auch flankierende Homologien zur *galK*-kan Kassette trägt. Nach Transformation in elektro- und rekombinations-kompetente SW102 Bakterien, die den BAC HSV-1(17⁺)lox mit der eingefügten Selektionskassette tragen, wurden die Bakterien in 10 ml LB-Medium für 4,5 h bei 32°C unter Schütteln inkubiert. Diese lange Wachstumsperiode ohne Selektionsdruck durch Antibiotika ist erforderlich, damit man die Bakterien erhält, welche nur eine BAC Kopie mit der gewünschten Rekombination tragen. Ansonsten würde jedes Bakterium mehrere Kopien enthalten, wovon nur wenige die *galK*-kan Kassette verloren hätten. Nach Inkubation wurde 1 ml der Kultur entnommen und die Bakterien mit 20.000 x g für 30 s abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde zweimal mit 1 ml PBS gewaschen, anschließend in 1:10 und 1:100 Verdünnungen auf M63 Minimalnährböden mit 0,2% Glycerol und DOG ausplattiert und für 3 Tage bei 32°C inkubiert. DOG-resistente Bakterienkolonien wurden wiederum auf MacConkey-Agarplatten mit 1% Galaktose ausgestrichen und für weitere zwei Tage bei 32°C inkubiert. Bakterien mit erfolgreicher zweiter Rekombination zeigten eine weiße Koloniefarbe, einem Indikator für den Verlust des *galK* Gens. Nach Isolierung der BAC DNA wurde diese durch Restriktionsanalyse (siehe Abschnitt 3.2.5.5) und Sequenzierung (siehe Abschnitt 3.2.5.13) auf ihre Richtigkeit überprüft.

<u>MacConkey-Agarplatten:</u>	10 g	MacConkey-Agar (Sigma)
	225 ml	H ₂ O

autoklavieren, auf 50°C abkühlen lassen und hinzufügen:

25 ml	Galaktose (10%)
25 µg/ml	Chloramphenicol

<u>5x M63 Salz (1 l):</u>	10 g	(NH ₄) ₂ SO ₄
	68 g	KH ₂ PO ₄
	2,5 mg	FeSO ₄ x 7 H ₂ O

mit KOH auf pH 7 einstellen

<u>M63 Minimalmedium:</u>	4 g	Agar
	200 ml	H ₂ O

autoklavieren, auf 50°C abkühlen lassen und hinzufügen:

50 ml	5x M63 Salz
0,5 ml	MgSO ₄ (1M)
1,25 ml	D-Biotin (0,2 mg/ml)
1,1 ml	L-Leucin 10 mg/ml)
5 ml	Glyzerol (10%)
5 ml	2-Deoxy-Galaktose (DOG) (10%)
25 µg/ml	Chloramphenicol

Alle in dieser Arbeit hergestellten HSV-1 BAC sind in Tabelle 3.15 zusammengefasst.

3.2.7. Biochemische Methoden

3.2.7.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können negativ beladene Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts im elektrischen Feld aufgetrennt werden (Laemmli, 1970). Dafür wurden diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgele hergestellt, die sich aus einem 10%-igen Trenngel und einem 5%-igen Sammelgel zusammensetzten. Das Gel wurde in die Elektrophoreseapparatur (Biorad) eingespannt und mit 1 x SDS-Laufpuffer befüllt. Zur Herstellung des Zelllysats wurden pelletierte Hela Zellen eines 6- bzw. 12-wells mit 300 µl bzw. 150 µl 2x SDS-Probenpuffer gemischt, bei 95°C für 5 min denaturiert und davon 10 µl auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 100 V und 250 mA für 90 min, zum Größenvergleich wurde ein Molekulargewichtsstandard mitgeführt.

<u>Trenngel (10%):</u>	2,5 ml	1,5 MTris-HCl pH 8,8
	3,33 ml	Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)
	100 µl	SDS-Lösung (10% (w/v))
	4,01 ml	H ₂ O _{bidest.}
	100 µl	APS (10% (w/v))
	35 µl	TEMED

<u>Sammelgel (5%):</u>	1,25 ml	1,5 MTris-HCl pH 8,8
	650 µl	Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)
	50 µl	SDS-Lösung (10% (w/v))
	3,05 ml	H ₂ O _{bidest.}
	35 µl	APS (10% (w/v))
	35 µl	TEMED

<u>1x SDS-Laufpuffer (1 l):</u>	1 g	SDS
	3,03 g	Tris
	14,4 g	Glyzin

<u>2x SDS-Probenpuffer:</u>	130 mM	Tris-HCl pH 6,8
	4% (w/v)	SDS
	20% (v/v)	Glyzerin
	0,02% (w/v)	Bromphenolblau
	100 mM	DTT

3.2.7.2. Proteintransfer und Immunoblot

Der Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran erfolgte mit Hilfe des Protean II Systems (BioRad) unter Verwendung von Transferpuffer bei 100 V und 250 mA für 60 min. Um die erfolgreiche Übertragung der Proteine zu überprüfen und die Banden des Molekulargewichtsstandards zu markieren, wurde die Membran im Anschluss kurz mit einer Ponceau-Lösung angefärbt. Nach Entfärbung in 1x TBS-T wurden unspezifische Bindestellen durch eine 30-minütige Inkubation in Blockierlösung (1x TBS-T mit 5% Milchpulver bzw. 1x TBS-T mit 5% BSA) abgesättigt. Die Inkubation mit dem spezifischen Primärantikörper erfolgte ebenfalls in Blockierlösung über Nacht bei 4°C. Anschließend wurde die Membran dreimal 5 min mit 1x TBS-T gewaschen, 3 h mit dem entsprechenden Peroxidase-gekoppelten (*horseradish peroxidase* = HRP) Sekundärantikörper in Blockierlösung bei Raumtemperatur inkubiert und erneut dreimal gewaschen. Um die HRP-konjugierten Antikörper zu visualisieren, wurde die Membran mit dem ECL-System (*enhanced chemiluminescence*, GE Healthcare) nach Herstellerangaben inkubiert und zuletzt die spezifisch markierten Proteinbanden mit Hilfe eines Röntgenfilms (Agfa) detektiert.

<u>1x Transferpuffer pH 8,3 (1 l):</u>	3,03 g	Tris
	14,4 g	Glyzin
	200 ml	Methanol

<u>Ponceau-Lösung:</u>	0,1% (w/v)	Ponceau S
	5% (v/v)	Essigsäure

<u>1x TBS-T (1 l):</u>	9 g	NaCl
	10 ml	Tris-HCl pH 7,8
	1 ml	Tween 20

3.2.7.3. Modifizierter LUMIER Assay

Zur Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen wurde ein modifizierter LUMIER Assay (*Luminescence based Mammalian Interactome mapping*) in Zusammenarbeit mit Manfred Kögl am DKFZ in Heidelberg durchgeführt (Abb. 3.2) (Braun *et al.*, 2009).

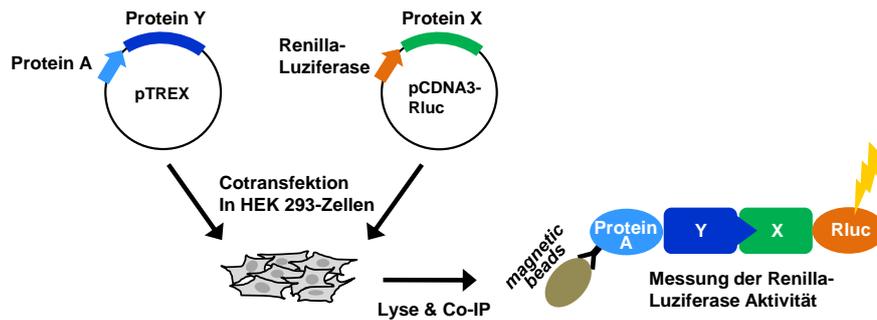


Abbildung 3.2: Der modifizierte LUMIER Assay

Die kodierenden Sequenzen der potentiellen Interaktionspartner werden in die LUMIER Expressionsvektoren mittels Gateway®-System kloniert, in HEK293 Zellen cotransfiziert und nach 40 h die Zellen lysiert. Durch stabile Bindung des Protein A-Hybridproteins an IgG-gekoppelte magnetische Kügelchen (*magnetic beads*) kann der gebildete Proteinkomplex aus dem Lysat gereinigt werden. Durch Messung der gebundenen *Renilla reniformis* Luziferase Aktivität kann eine Protein-Protein-Interaktion schließlich nachgewiesen werden.

Die zu testenden Proteine wurden als Hybridproteine entweder N-terminal mit dem *Staphylococcus aureus* Protein A-tag oder der *Renilla reniformis* Luziferase fusioniert und in HEK293 Zellen in 96-well Platten transient exprimiert. Dafür wurden jeweils 20 ng des jeweiligen Expressionskonstrukts in 1×10^4 HEK293 Zellen mit 0,05 μ l Lipofectamine 2000 transfiziert. Nach 40 h Inkubation wurde das Medium abgenommen und die Zellen auf Eis mit 10 μ l kaltem Lysepuffer versetzt, welcher zusätzlich Schaf-anti-Kaninchen IgG-gekoppelte magnetische Kügelchen (2 mg/ml Endkonzentration) enthält. Nach 15-minütiger Lyse wurden 100 μ l Waschpuffer pro well zugegeben und 10% des verdünnten Lysats (*input* Probe) abgenommen. Das übrige Lysat wurde mit Hilfe des Tecan *Hydroflex plate washers* sechsmal mit Waschpuffer gewaschen. Die Luziferase-Aktivität wurde anschließend sowohl von den *input* Proben (zur späteren Normalisierung auf die Transfektionseffizienz) wie auch von den gewaschenen Kügelchen (*bound* Proben) gemessen und somit die Protein-Protein-Interaktion über die Aktivität des co-gereinigten Luziferase-Hybridproteins nachgewiesen. Als Negativkontrolle (*negative control, nc*) wurde jedes Luziferase-Hybridprotein auf eine Interaktion mit einem Protein A-Dimer-Hybridprotein getestet (*input nc* sowie *bound nc*), um unspezifische Bindungen an den Protein A-tag auszuschließen. Normalisierte Interaktionssignale wurden wie folgt berechnet: $\log_{(bound)} / \log_{(input)} - \log_{(bound\ nc)} / \log_{(input\ nc)}$.

Die normalisierten und korrigierten Daten wurden anschließend z-transformiert, indem jeweils der Mittelwert der Proben durch die Standardabweichung dividiert wurde. LUMIER Tests mit einem z-Faktor größer oder gleich 1,0 wurden als positiv gewertet.

<u>Lysepuffer:</u>	20 mM	Tris/HCl pH 7,5
	250 mM	NaCl
	1%	TritonX-100
	10 mM	EDTA
	10 mM	DTT
	0,0125 U / μ l	Benzonase

	0,0125 U / μ l	Protease Inhibitor
	0,0125 U / μ l	Phosphatase Inhibitor
<u>Waschpuffer:</u>	1 x	PBS
	1 mM	DTT

3.2.8. Hefegenetische Methoden

3.2.8.1. Hefe-2-Hybridsystem (*Yeast-2-Hybrid, Y2H*)

Zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen wurde das Hefe-2-Hybridsystem (Y2H) angewendet (Abb. 3.3). Das Prinzip beruht auf dem Transkriptionsfaktor Gal4 der Hefe, der aus einer DNA-bindenden Domäne (BD) und einer Aktivierungsdomäne (AD) besteht, wobei die Transkription nur aktiviert werden kann, wenn diese beiden Domänen in räumlicher Nähe zueinander stehen (Fields und Song, 1989). Im Y2H-System werden nun die kodierenden Sequenzen der zwei potentiellen Interaktionspartner jeweils an die beiden Gal4-Domänen fusioniert und in Hefezellen exprimiert. Das Gal4-BD-Fusionsprotein wird dabei als *bait*, das Gal4-AD-Fusionsprotein als *prey* bezeichnet. Bei einer positiven Interaktion zwischen *bait* und *prey* im Zellkern wird die Funktionalität des Gal4 rekonstituiert und somit der GAL4-Promotor transaktiviert. Dadurch kommt es zur Expression des Reportergens *HIS3*, dessen Produkt, die Histidin-Synthase, das Wachstum auf Histidin-freiem Nährmedium ermöglicht

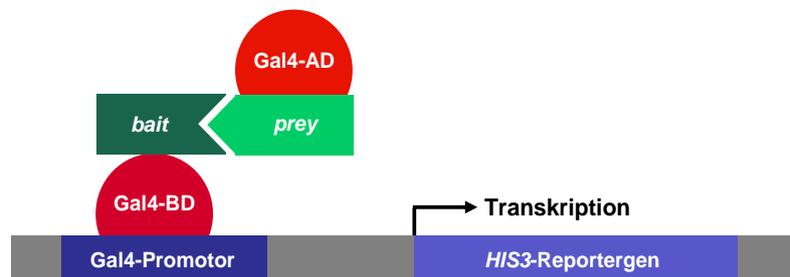


Abbildung 3.3: Das Hefe-2-Hybridsystem (Y2H)

Die kodierenden Sequenzen der potentiellen Interaktionspartner werden als *bait*- bzw. *prey*-Fusionsproteine in Hefezellen exprimiert. Bei Interaktion von *bait* und *prey* gelangen DNA-Bindedomäne (BD) und Aktivierungsdomäne (AD) des Gal4-Transkriptionsfaktors in räumliche Nähe zueinander, wodurch die Funktion des Gal4 rekonstituiert und die Expression des *HIS3*-Reportergens initiiert wird.

Das Y2H-System wurde auf Agarplatten mit entsprechendem Selektionsmedium durchgeführt. Die *bait*-Genprodukte wurden in das Plasmid pGBKT7, die *prey*-Genprodukte in das Plasmid pGADT7 kloniert. Anschließend wurden diese in die jeweiligen Hefestämme mit unterschiedlichem *Mating*-Typus transformiert und aufgrund von Auxotrophiemarkern selektioniert (pGBKT7: *TRP1*-Gen, Tryptophan-auxotroph; pGADT7: *LEU2*-Gen, Leucin-auxotroph). Zum *Mating* wurden jeweils die frisch transformierten Zellen der beiden Hefestämme auf YPD-Agar vermischt und 5 h bei RT inkubiert. Dann wurden die Hefezellen auf Doppel-Selektivplatten übertragen (SD-LW), worauf nur diploide Zellen, die beide Plasmide tragen, wachsen können. Nach einer 3-tägigen Inkubation bei 30°C wurden diese

auf Dreifach-Selektivplatten (SD-LWH) ausgestrichen, erneut 3 Tage bei 30°C inkubiert und schließlich auf die Aktivität des Reportergens *HIS3* überprüft. Um ein unspezifisches Hintergrundsignal des *HIS3*-Reportergens zu unterdrücken, wurden dem Medium zusätzlich verschiedene Konzentrationen 3-Aminotriazol (3-AT), einem kompetitiven Inhibitor der Histidin-Synthase, hinzugefügt.

3.2.9. Mikroskopische Methoden

3.2.9.1. Indirekte Immunfluoreszenz (IF)

Säugerzellen wurden auf Deckgläschen in der Regel in *12-well* Platten mit 60-80% Konfluenz ausgesät und je nach Fragestellung behandelt (unbehandelt, DNA- bzw. siRNA-Transfektion, HSV-1 Infektion). Nach Inkubation unter Standardbedingungen wurden die Zellen zu den entsprechenden Zeitpunkten zunächst für 15 min mit 2% Formaldehyd in PBS bei Raumtemperatur fixiert, dreimal kurz mit PBS gewaschen, mit eiskaltem 0,5% Triton X-100 in PBS permeabilisiert und erneut dreimal gewaschen. HSV-1 infizierte Zellen wurden zusätzlich mit 200 µg/ml humanem Immunglobulin G in PBS für 3 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Dies diente zur Absättigung der membranständigen Glykoproteindimere gE/gI in HSV-1-Partikeln, die als Rezeptoren für den konstanten Teil von Antikörpern (Fc) fungieren können. Anschließend wurden die Zellen mit spezifischen Primärantikörpern für 15 min in PBS bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 5 min mit PBS erfolgte analog die Markierung mit den entsprechenden Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörpern. Um die Zellkerne darzustellen, wurde die zelluläre DNA spezifisch für 5 min mit dem Fluorochrom DAPI (0,5 µg/ml in PBS) angefärbt. Zuletzt wurden die Zellen dreimal mit PBS und zur Entfernung der Salze einmal mit deionisiertem Wasser gewaschen und die Deckgläschen schließlich mit der Zellseite nach unten in einem Tropfen *Mounting Medium* (Dianova) auf dem Objektträger eingebettet. Die Mikroskopie der Präparate wurde entweder am Fluoreszenzmikroskop (Leica DM4000B) oder am Konfokalmikroskop (Leica TCS SP5) mit der zugehörigen Kamera und Software durchgeführt. Die Bearbeitung der Bilder erfolgte durch Adobe Photoshop.

3.2.9.2. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurde in Kooperation mit B. Klupp und H. Granzow am Institut von T. C. Mettenleiter (Friedrich-Loeffler-Institut, Greifswald - Insel Riems, D) durchgeführt. Dafür wurden Hela Zellen in *6-well* Platten zuerst mit siRNA behandelt, nach 48 h mit HSV-1(F) (MOI 1) infiziert und 12 h bzw. 15 h unter Standardbedingungen inkubiert. Die anschließende Fixierung und Einbettung der Zellen erfolgte wie kürzlich beschrieben (Granzow *et al.*, 1997). Die hergestellten Ultradünnschnitte wurden anschließend mit einem Tecnai 12 Elektronenmikroskop (Philips, Eindhoven, Niederlande) untersucht.

4. ERGEBNISSE

4.1. Funktionale Charakterisierung des UL34 *tail anchors*

Für die Auswanderung der Nukleocapside aus dem Zellkern von HSV-1 infizierten Zellen ist das integrale Protein UL34 essentiell, welches gemeinsam mit seinem Interaktionspartner UL31 den NEC an der INM bildet. Zwei Domänen innerhalb von UL34 können klar unterschieden werden: eine ins Cyto- bzw. Nukleoplasma ragende N-terminale Domäne, welche UL31-Bindestellen enthält, und eine hydrophobe C-terminale Region, welche eine α -helikale Transmembrandomäne (TMD) beinhaltet und somit für die Membranverankerung des Proteins verantwortlich ist. Aufgrund dieser Domänenanordnung wurde postuliert, dass UL34 zu der Gruppe der *tail anchor* (TA) Proteine gehört. Über die Funktion der einzelnen Domänen ist noch wenig bekannt, jedoch ist außer dem N-terminalen Bereich auch die *tail anchor* Region für die Virusreplikation essentiell (Shiba *et al.*, 2000; Yamauchi *et al.*, 2001; Bjerke *et al.*, 2003; Roller *et al.*, 2010).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun der *tail anchor* von UL34 im Hinblick auf die in ihm enthaltenen Informationen und Anforderungen detailliert untersucht werden, um erste mechanistische Einblicke über die genaue Rolle des TA für die Membraninsertion und Zielsteuerung zur INM sowie für den viralen Replikationsverlauf im generellen zu gewinnen. Dazu wurde eine Reihe von UL34 TA-Mutanten hergestellt. Zum einen wurde die TMD sukzessive deletiert, um dessen minimale Länge für eine stabile und funktionale Membranverankerung zu bestimmen. Ebenso wurden mehrere TMD-Permutationen durchgeführt, bei welchen der TA von UL34 sowohl mit den entsprechenden Regionen von verschiedenen herpesviralen und zellulären TA-Proteinen als auch mit einem alternativen INM-Verankerungsmechanismus ausgetauscht wurde, um die sequenz-spezifischen Informationen des UL34 *tail anchors* zu analysieren. Die funktionale Charakterisierung dieser UL34 Mutanten im viralen Kontext wurde dabei durch die BAC Technologie ermöglicht.

Im Vorfeld konnte bereits durch einen gekoppelten *in vitro* Transkriptions-/Translations-Assay gezeigt werden, dass die Membraninsertion von UL34 über einen post-translationalen Weg erfolgt und von der C-terminalen hydrophoben TMD vermittelt wird, wie es charakteristisch für TA-Proteine ist (Ott *et al.*, 2011).

4.1.1. Herstellung von HSV-1 UL34 TA-Mutanten

Für die genetische Analyse des *tail anchors* von UL34 wurden mittels BAC Mutagenese mit dem bereits klonierten BAC HSV-1(17⁺)lox verschiedene UL34 TA-Mutationen in das herpesvirale Genom eingeführt. Dazu wurde ein modifiziertes *galk*-kan positiv/negativ-Selektionsprinzip angewendet (siehe Abschnitt 3.2.6), welches in Abbildung 4.1 dargestellt ist.

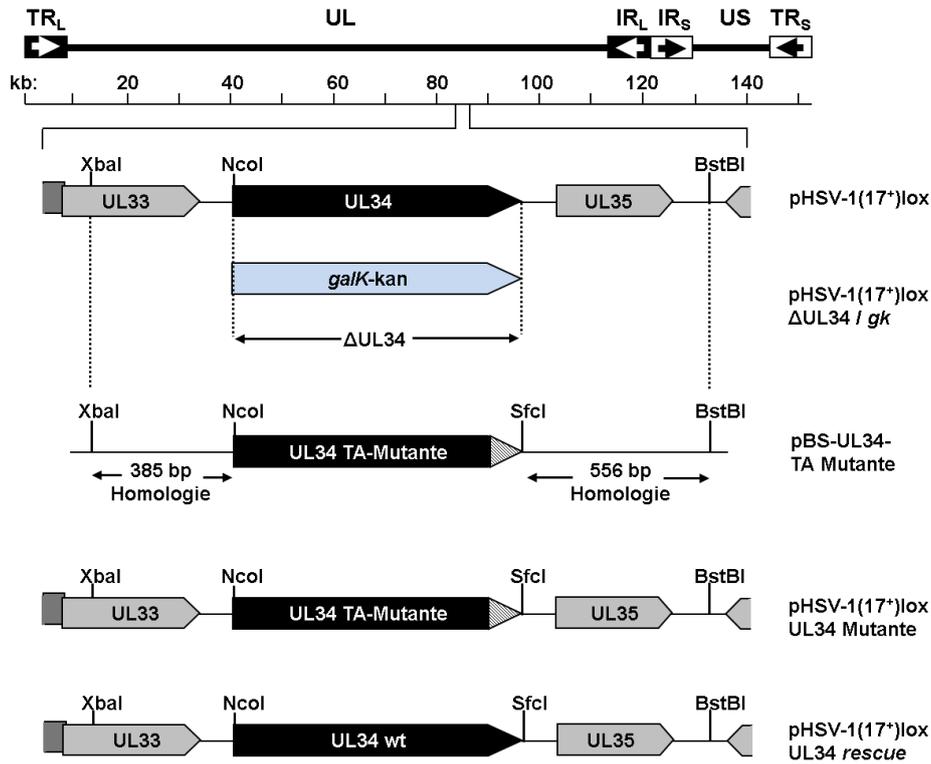


Abbildung 4.1: Herstellung von HSV-1 UL34 TA-Mutanten mittels BAC Mutagenese

Die schematische Darstellung des HSV-1(17⁺)lox Genoms zeigt die *unique long* (UL) and *unique short* (US) Regionen, welche von *terminal* (TR_L und TR_S) und *internal* (IR_L und IR_S) *repeats* flankiert werden. Die Zahlen geben die Position in Kilobasenpaaren (kb) an. Die relevanten offenen Leserahmen von UL34 und benachbarten Genen (als Pfeile) sowie Restriktionsschnittstellen sind gekennzeichnet. Die UL34 TA-Mutanten wurden mittels PCR amplifiziert, mit entsprechenden Restriktionsschnittstellen versehen und in den Vektor pBlueScript (pBS) subkloniert, in welchem die 5'- und 3'-Enden von UL34 von authentischen homologen Sequenzbereichen flankiert sind. Durch den Verdau mit *Xba*I/*Bst*BI entstand ein Fragment, das sich aus der kodierenden Sequenz von UL34wt bzw UL34 Mutante und zusätzlichen flankierenden Homologien zusammensetzte. Für die Herstellung der HSV-1(17⁺)lox UL34 Mutanten wurde die Mutagenese mit dem BAC HSV-1(17⁺)lox nach einem modifizierten *galk*-kan positiv/negativ-Selektionsprinzip durchgeführt. Der UL34 Lokus wurde hier durch die *galk*-kan (*gk*) Kassetten mittels homologer Rekombination ersetzt, welche im zweiten Schritt wiederum durch das Fragment einer UL34 TA-Mutante ausgetauscht wurde. Parallel wurde die Selektionskassette auch mit einem UL34wt Gen substituiert und der resultierende BAC als HSV-1(17⁺)lox UL34 *rescue* oder UL34wt bezeichnet.

Im ersten Schritt wurde die kodierende Sequenz von UL34, welche im Genom zwischen 84923 bp bis 85750 bp liegt, durch homologe Rekombination mit der *galk*-kan (*gk*) Kassetten ersetzt. In dem daraus resultierenden BAC HSV-1(17⁺)lox ΔUL34/*gk* ist das UL34 Gen somit vollständig deletiert, ohne dass dabei die offenen Leserahmen der angrenzenden Gene UL33 und UL35 beeinflusst werden. Aus diesem Grund wurde dieses BAC als eine UL34-Deletionsmutante angesehen. Im zweiten Schritt wurde die Selektionskassette auf dieselbe Weise wieder mit einem Wildtyp (wt) Gen oder einer mutierten Version des UL34 Gens ausgetauscht. Die dadurch entstandenen BAC HSV-1(17⁺)lox UL34 Mutanten enthielten nun ein gezielt am *tail anchor* mutiertes UL34 Gen. Der Selektionsmarker wurde parallel dazu mit einem UL34 wt Gen ausgetauscht und der resultierende BAC HSV-1(17⁺)lox UL34 *rescue*

als UL34 wt verwendet. Die eingesetzten Fragmente, welche die UL34 TA-Mutanten kodierten, wurden zuerst mittels PCR amplifiziert, dabei mit geeigneten Restriktionschnittstellen (*NcoI/SfcI*) versehen und in den Vektor pBlueScript pBS-UL34-BAC subkloniert, in welchem die kodierende Sequenz von UL34 auf beiden Seiten durch authentische homologe Sequenzbereiche flankiert war. Mittels Restriktionsverdau mit *XbaI* und *BstBI* entstand dabei ein Fragment, das sich aus der kodierenden Sequenz einer UL34 Mutante bzw. UL34 wt und flankierenden homologen Nukleotiden zusammensetzte. Diese zum BAC HSV-1(17⁺)lox homologen Bereiche sind eine unabdingbare Voraussetzung für eine erfolgreiche Rekombination. Alle hierfür verwendeten *Templates* und Oligonukleotide sind unter Material und Methoden in den Tabellen 3.7 und 3.15 zusammengefasst.

Die neu generierten HSV-1 BAC Mutanten wurden durch Sequenzierung des UL34 Lokus auf ihre Richtigkeit, d.h. auf korrekte Insertion und Kodierung, überprüft. Zusätzlich wurden alle BAC Klone nach jedem Mutageneseschritt mittels Restriktionsanalyse charakterisiert. Dies war nötig, um zum einen unerwünschte Rekombinationsereignisse z.B. zwischen Sequenzwiederholungen im Virus-Genom auszuschließen, aber auch um die nach den jeweiligen Rekombinationsschritten erwarteten Veränderungen der DNA-Fragmente zu überprüfen. Dazu wurde jeweils die BAC DNA isoliert, mit der Restriktionsendonuklease *MluI* verdaut und die Restriktionsmuster mit den vorhergesagten Fragmenten verglichen. Durch die Insertion der *galk-kan* Kasette wurde dabei eine zusätzlich *MluI*-Schnittstelle im BAC HSV-1(17⁺)lox Δ UL34/*gk* eingefügt, so dass ein ursprüngliches 4,6 kb großes Fragment des HSV-1(17⁺)lox BAC verschwand, dafür aber zwei neue Fragmente mit einer Größe von 4,2 kb und 1,8 kb entstanden. Nach dem Ersetzen der Selektionskasette mit den jeweiligen UL34 TA-Mutanten erhielt man wieder ein zum ursprünglichen BAC HSV-1(17⁺)lox identisches Restriktionsmuster. In Abbildung 4.2 A ist dies am Beispiel für die Herstellung des HSV-1(17⁺)lox UL34 *rescue* BAC dargestellt, welcher für alle weiteren Experimente als HSV-1 UL34 wt verwendet wurde. Von diesem sowie vom ursprünglichen BAC HSV-1(17⁺)lox wurden durch Transfektion von BAC DNA in Vero Zellen rekombinante Viren rekonstituiert und anschließend auf ihr Wachstumsverhalten überprüft (Abb. 4.2 B). Dabei wies der durch BAC Mutagenese generierte HSV-1 UL34 wt eine nahezu identische Wachstumskinetik wie der unbehandelte HSV-1(17⁺)lox auf, so dass dieser sehr gut als Wildtyp-Kontrolle verwendet werden konnte.

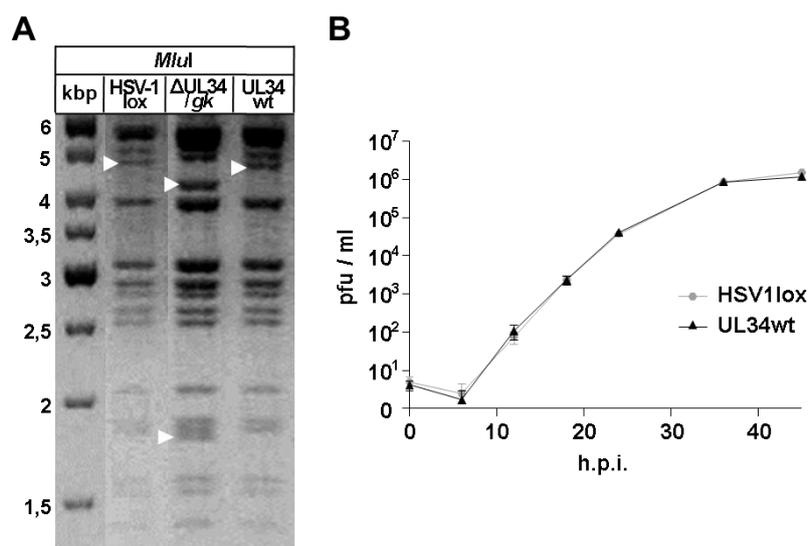


Abbildung 4.2: Charakterisierung der HSV-1(17⁺)lox UL34 BAC Mutagenese

A) Die DNA des ursprünglichen BAC HSV-1(17⁺)lox (HSV-1lox) sowie der neu generierten BAC HSV-1(17⁺)lox Δ UL34/gk (Δ UL34/gk) und UL34 rescue (UL34wt) wurde isoliert und nach Restriktionsverdau mit *Mlu*I im 0,8% TBE-Agarosegel 16 h aufgetrennt. Es ist nur der Bereich dargestellt, welcher Veränderungen im Restriktionsmuster (weiße Dreiecke) aufgrund der *galk*-kan Insertion enthält. **B)** Zum Vergleich der Wachstumskinetiken von HSV-1(17⁺)lox und HSV-1(17⁺)lox UL34wt wurden Vero Zellen in Triplikaten mit einer MOI von 0,1 infiziert, der Kulturüberstand an mehreren Zeitpunkten nach Infektion (h.p.i.) abgenommen und der Virustiter (pfu/ml) jeweils mittels *Plaque Assay* bestimmt.

4.1.2. Analyse der TMD-Deletionen von UL34

Der *tail anchor* von UL34 enthält eine α -helikale TMD aus 20 Aminosäuren (As. 252-272), mit welcher das Protein in die Membran inseriert wird. Um die minimale Länge der TMD zu bestimmen, die für eine stabile und funktionale Membranverankerung von UL34 gerade noch ausreicht, wurden zuerst mehrere Plasmid-kodierte C-terminale Deletionsmutanten hergestellt, bei welchen die TMD schrittweise verkürzt wurde (Abb. 4.3 A). Diese Mutanten sowie UL34 wt wurden transient in Hep2 Zellen exprimiert und anschließend ihre subzelluläre Lokalisation mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert (Abb. 4.3 B). Dabei wiesen die beiden TA-Mutanten UL34s269 (As. 1-269) und UL34s267 (As. 1-267), welche eine nur noch 17 bzw. 15 Aminosäuren lange TMD enthalten, in Abwesenheit anderer viraler Proteine eine ER-ähnliche Verteilung mit einem beträchtlichen Anteil von UL34 an der Kernperipherie auf, wie es auch für UL34 wt (As. 1-275) der Fall war. Nach Coexpression mit UL31 konnte eine Rekrutierung von UL34 wt und auch der Deletionsmutanten zur Kernperipherie sowie eine Colokalisation mit UL31 beobachtet werden. Eine Deletion von zwei weiteren Aminosäuren der TMD (UL34s265, As. 1-265) führte jedoch zu einer ausschließlich nukleoplasmatischen Lokalisation des Proteins, wobei die typische Kernhüllenfärbung fehlte, vergleichbar einer UL34s256 Mutante (As. 1-256), welche eine noch drastischere TA-Deletion enthält. Diese Transfektionsdaten deuten darauf hin, dass ein minimaler *tail anchor* von 15 Aminosäuren für die stabile Membraninsertion von UL34 und für die Bildung des NEC an der Kernmembran ausreichend ist.

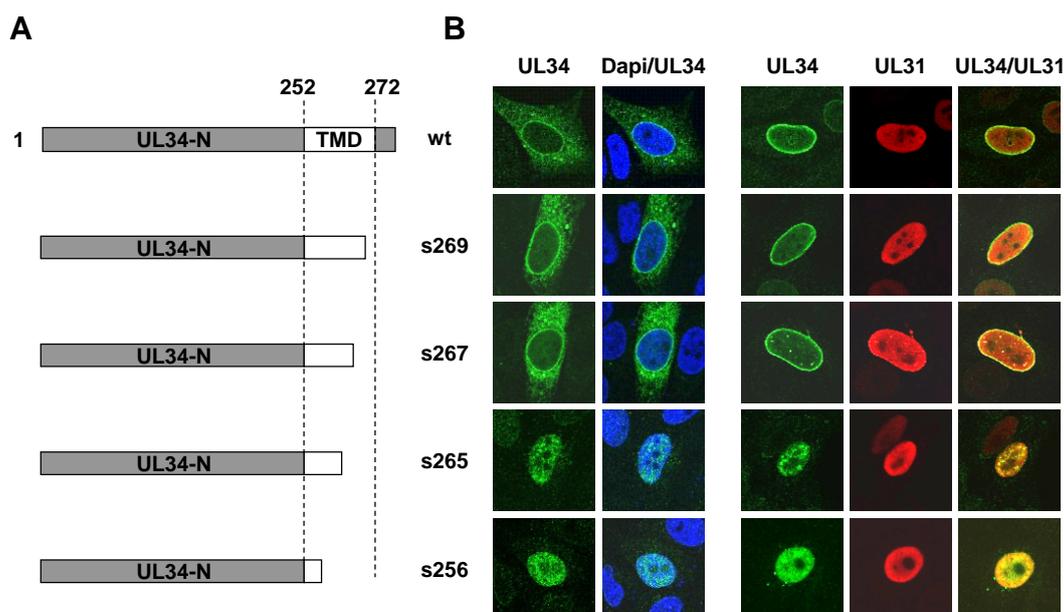


Abbildung 4.3: Eine minimale TMD von 15 Aminosäuren ist ausreichend für die stabile Membraninsertion von UL34

A) Zur Bestimmung der minimalen Länge der TMD, welche für die stabile Membranverankerung von UL34 benötigt wird, wurden C-terminale Deletionsmutanten hergestellt, bei welchen die *tail* Region sukzessive verkürzt wurde. UL34 wt (As. 1-275) sowie die Mutanten s269 (As. 1-269), s267 (As. 1-267), s265 (As. 1-265) und s256 (As. 1-256) sind schematisch dargestellt. **B)** Hep2 Zellen wurden mit Plasmiden, die *Strep*-UL34 wt oder die Mutanten s269, s267, s265, s256 kodierte, entweder alleine oder in Kombination mit *myc-getaggtem* UL31 Plasmid transfiziert. Die Expression und subzelluläre Lokalisation der Proteine wurde nach 20 h durch indirekte Immunfluoreszenz unter Verwendung eines monoklonalen anti-*Strep-tagII* (grün) bzw. polyklonalen anti-*myc* (rot) Antikörpers und der entsprechenden Sekundärantikörpern analysiert. Die Zellkerne wurden mittels Dapi-Färbung (blau) visualisiert.

Im nächsten Schritt wurden mehrere UL34 TMD Deletionsmutanten mit Hilfe der BAC Mutagenese funktional charakterisiert, um die minimale Länge des *tail anchors* von UL34 im viralen Kontext zu bestimmen. Dafür wurde die Fähigkeit von verschiedenen Deletionsmutanten zur Komplementation des HSV-1 Δ UL34/*gk* BAC untersucht, welcher nicht lebensfähig ist, d.h. eine Deletion von UL34 führt zu einer Mutante, die nicht mehr in der Lage ist, effizient Nachkommen-Viren zu bilden. Mittels BAC DNA Transfektion in Vero Zellen und einer anschließenden *Plaque* Analyse durch indirekte Immunfluoreszenz mit Hilfe eines ICP0 spezifischen Antikörpers konnte dies bestätigt werden, da im Gegensatz zu UL34 wt keine zytopathischen Effekte wie die Ausbildung von *Plaques* beobachtet werden konnten (Abb. 4.4. B obere Hälfte). Die generierten BAC wurden anschließend in Vero Zellen transfiziert und auf Virus-Rekonstitution getestet. Dabei waren nur die BAC in der Lage durch effiziente Virusreplikation Nachkommen-Viren zu produzieren, bei welchen die Selektionskassette mit der kodierenden Sequenz von UL34 wt, UL34s269 oder UL34s267 ersetzt wurde (Abb. 4.4 A). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Transfektionsstudie waren daher sowohl HSV-1 UL34s269 als auch HSV-1 UL34s267 vollständig funktional und wiesen ein Wildtyp-ähnliches Verhalten in ihrer Wachstumskinetik sowie in ihrer subzellulären

Lokalisation auf. Für die Charakterisierung der Wachstumseigenschaften wurden Vero Zellen mit einer MOI von 0,1 mit rekombinanten Viren infiziert, zu verschiedenen Zeitpunkten der Kulturüberstand abgenommen und mittels *Plaque Assay* die Anzahl der infektiösen Viruspartikel bestimmt. Die daraus resultierenden Wachstumskurven für die beiden UL34 TMD-Deletionsmutanten waren nahezu identisch zum Wachstumsverhalten von HSV-1 UL34 wt (Abb. 4.4 C). Auch die indirekte Immunfluoreszenz Analyse mit Hilfe eines UL34 spezifischen Antikörpers zeigte nach Infektion mit rekombinanten Viren eine Lamin A/C-ähnliche Kernhüllenfärbung von UL34 wt, UL34s269 und UL34s267 (Abb. 4.4 D).

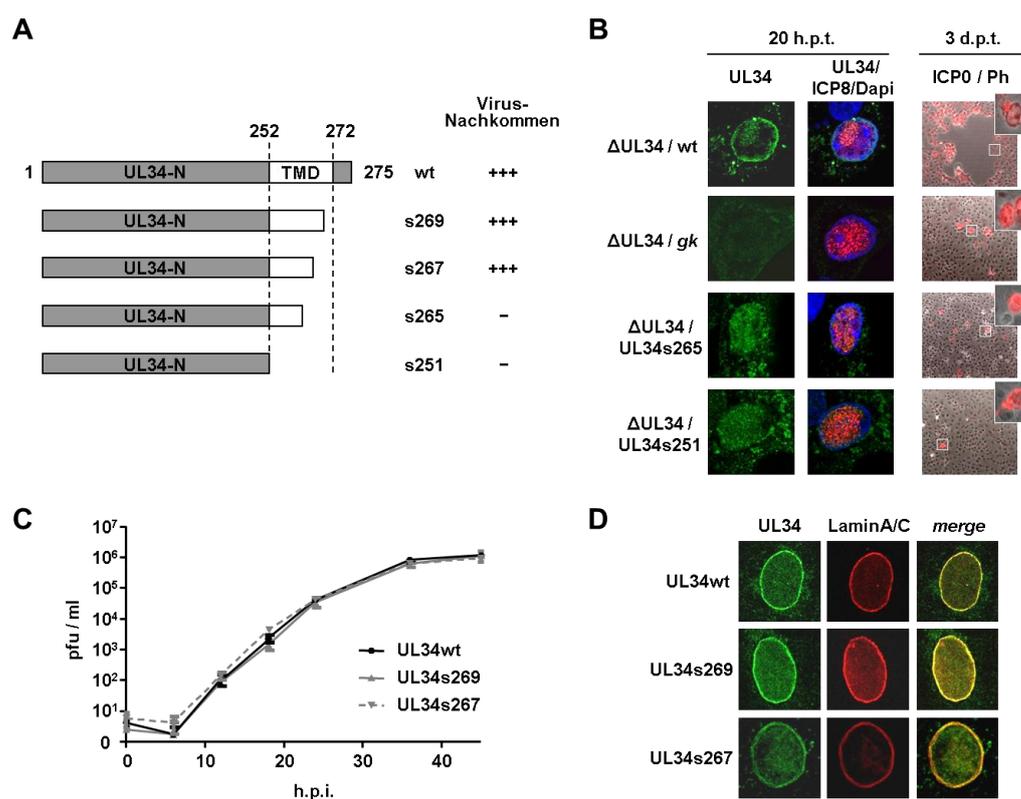


Abbildung 4.4: Analyse der HSV-1 UL34 BAC Mutanten mit TMD-Deletionen

A) Die neu generierten HSV-1 BAC Mutanten, bei welchen die Selektionskassette mit UL34wt sowie mit den UL34 TMD-Deletionsmutanten s269, s267, s265, s251 ersetzt wurde, sind graphisch dargestellt. Ihre Fähigkeit zur Bildung von Virus-Nachkommen wurde durch Transfektion der BAC DNA in Vero Zellen überprüft (3 d.p.t.) und auf der rechten Seite zusammengefasst (+++ = wt-ähnliche Rekonstitution; - = keine Virus-Rekonstitution). **B)** Die Deletion von UL34 in HSV-1 (Δ UL34/*gk*) und das Wiedereinsetzen von UL34wt (Δ UL34/wt) oder den TA-Verkürzungsmutanten (Δ UL34/UL34s265 bzw. Δ UL34/UL34s251) wurde durch Transfektion der entsprechenden BAC DNA in Vero Zellen und einer anschließenden indirekten Immunfluoreszenz Analyse nach 20 h (20 h.p.t.) mittels polyklonalem anti-UL34 und monoklonalem anti-ICP8 Antikörper (rot) überprüft, wobei die Zellkerne mittels Dapi-Färbung (blau) visualisiert wurden. Ebenso wurde eine indirekte Immunfluoreszenz nach 3 Tagen Transfektion (3 d.p.t.) mit Hilfe eines monoklonalen anti-ICP0 Antikörpers durchgeführt, um potentielle *Plaquebildungen* anzufärben. ICP0-positive Zellen sind rot dargestellt und mit dem Phasenkontrast (Ph) überlagert. **C)** Zur Bestimmung der Wachstumskinetik von HSV-1 UL34wt im Vergleich zu den Mutanten HSV-1 UL34s269 und UL34s267 wurden Vero Zellen in Triplikaten infiziert (MOI 0,1), der Kulturüberstand zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion (h.p.i.) abgenommen und der Virustiter (pfu/ml) mittels *Plaque Assay* bestimmt. **D)** Die subzelluläre Lokalisation von UL34wt sowie den Mutanten UL34s269 und UL34s267 wurde durch indirekte Immunfluoreszenz 14 h nach Infektion von Vero Zellen mit den entsprechenden rekombinanten Viren unter Verwendung eines polyklonalen anti-UL34 und monoklonalen anti-Lamin A/C Antikörpers analysiert.

Im Gegensatz dazu führte die Deletion von zwei weiteren Aminosäuren der TMD zu der BAC Mutante UL34s265 (As. 1-265), welche den Δ UL34 BAC nicht mehr funktional komplementieren und somit keine Virus-Nachkommen bilden konnte. Die Mutante UL34s265 war vergleichbar mit einer UL34s251 (As. 1-251) Mutante, bei welcher die komplette TMD entfernt wurde (Abb. 4.4 A). Nach 20 h Transfektion (20 h.p.t.) von Vero Zellen mit den HSV-1 BAC Mutanten UL34s265 und UL34s251 konnte durch indirekte Immunofluoreszenz demonstriert werden, dass das mutierte UL34 zwar normal exprimiert wird, jedoch hauptsächlich im Nukleoplasma lokalisiert ist. Durch die Detektion von ICP8, mit welchem die viralen Replikationszentren im Zellkern visualisiert werden, konnte ebenso gezeigt werden, dass die Replikation des mutierten HSV-1 Genoms im Kern normal abläuft. Allerdings konnten drei Tage nach Transfektion der BAC DNA (3 d.p.t.) keine viralen *Plaquebildungen* beobachtet werden, wie auch schon für den Δ UL34 BAC beschrieben wurde (Abb. 4.4.B untere Hälfte).

Zusammenfassend konnte also gezeigt werden, dass eine minimale Länge des UL34 *tail anchors* gebildet aus 15 hydrophoben Aminosäuren sowohl für die Zielsteuerung zur INM als auch für eine stabile und funktionale Membranverankerung ausreichend ist. Ebenso wird eine TMD aus mindestens 15 Aminosäuren für die Ausbildung des NEC und dessen Funktion während der Virusreplikation benötigt. Diese *in vivo* Experimente deuten somit auf eine bestehende Korrelation zwischen der funktionalen Komplementation und der korrekten Lokalisation von UL34 an der Kernperipherie hin.

4.1.3. Analyse der TMD-Permutationen von UL34

Mehrere Studien mit zellulären TA-Proteinen deuten darauf hin, dass die Aminosäure-Zusammensetzung der TMD und demzufolge ihre Hydrophobizität die Zielsteuerung und Membraninsertion von TA-Proteinen entscheidend mitbestimmt. Ob der *tail anchor* von UL34 außer der Membranverankerung eine zusätzliche Rolle bei der Zielsteuerung zur Kernmembran und sonstigen Funktion des Proteins spielt, indem er wichtige sequenzspezifische Informationen enthält, sollte durch TMD-Permutationen entschlüsselt werden. Falls der *tail anchor* von UL34 Informationen beinhaltet, die für eine korrekte Lokalisation und Funktion des Proteins benötigt werden, sollten sich die Permutationen auf das Wachstumsverhalten der rekonstituierten Viren auswirken. Um dies zu testen, wurden verschiedene Mutanten hergestellt, bei welchen die C-terminale Region von UL34 (As. 252-275) durch die entsprechende TA-Region der UL34 orthologen Proteine UL50 von HCMV (As. 363-397) und BFRF1 von EBV (As. 318-336) bzw. der heterologen HSV-1 TA-Proteine UL56 (As. 211-234) und US9 (As. 69-90), welche beide eine TGN Lokalisation aufweisen, ausgetauscht wurde. Außerdem wurden auch UL34 Fusionsproteine mit der TA-Region des zellulären apoptotischen Faktors Bcl2 (As. 218-239) sowie Vamp2 (As. 95-116), einem Protein des sekretorischen Wegs, hergestellt (Abb.4.5). Die hier verwendeten TA-Proteine

unterscheiden sich kaum in der Länge der TMD, die zwischen 19 und 21 Aminosäuren liegt, jedoch in deren Hydrophobizität. Im Gegensatz zu UL34 (42,5) weist der *tail anchor* von Bcl2 (30,8) und EBV BFRF1 (32,2) eine geringere moderate Hydrophobizität auf, während HSV-1 UL56 (55,3) und Vamp2 (64,9) eine deutlich hydrophobere TMD besitzen. HCMV UL50 (42,3) und HSV-1 US9 (44,7) sind dagegen vergleichbar mit UL34 (Abb. 4.5). Zuerst wurden diese UL34 TA-Permutationsmutanten auf funktionale Komplementation des HSV-1 Δ UL34/*gk* BAC untersucht, indem die *galK*-kan Selektionskassette jeweils mit den kodierenden Sequenzen der TA-Mutanten ersetzt und die erzeugten BAC Mutanten anschließend in Vero Zellen rekonstituiert wurden. Dabei waren alle generierten HSV-1 BAC Mutanten in der Lage, rekombinante Viren gleichermaßen wie der UL34 wt BAC zu bilden, da eindeutige zytopathische Effekte nach drei Tagen beobachtet werden konnten (Abb. 4.5).

	252		TMD-Länge (As.)	Hydrophobizität	Virus- Nachkommen	
1	UL34-N	UL34	UL34 wt (As. 253-272)	20	42,5	+++
	UL34-N	UL50	UL34-N-UL50 (As. 363-397)	21	42,3	+++
	UL34-N	BFRF1	UL34-N-BFRF1 (As. 318-336)	19	32,2	+++
	UL34-N	UL56	UL34-N-UL56 (As. 211-234)	21	55,3	+++
	UL34-N	US9	UL34-N-US9 (As. 69-90)	22	44,7	+++
	UL34-N	Bcl2	UL34-N-Bcl2 (As. 218-239)	20	30,8	+++
	UL34-N	Vamp2	UL34-N-Vamp2 (As. 95-116)	21	64,9	+++

Abbildung 4.5: Permutation des UL34 *tail anchors* mit *tail* Regionen von herpesviralen und zellulären TA-Proteinen

Graphische Darstellung der UL34 TA-Permutationen, bei welchen die As. 252-275 von UL34 mit den TA-Regionen der orthologen Proteine HCMV UL50 (As. 363-397) und EBV BFRF1 (As. 318-336), der heterologen HSV-1 TA-Proteine UL56 (As. 211-234) und US9 (As. 69-90) sowie der zellulären TA-Proteine Bcl2 (As. 218-239) und Vamp2 (As. 95-116) ausgetauscht wurde. Die Länge der verwendeten TMD in As., deren Hydrophobizität (berechnet nach Kyte & Doolittle) sowie die Fähigkeit der generierten HSV-1 BAC Mutanten, rekombinante Viren nach Rekonstitution in Vero Zellen zu bilden, sind jeweils angegeben.

Anschließend wurden die Wachstumskinetiken der rekombinanten Viren nach Infektion von Vero Zellen bestimmt. Dabei konnte kein Unterschied in der Virusproduktion zwischen UL34 wt und den verschiedenen UL34 TMD-Mutanten beobachtet werden (Abb. 4.6 A). Auch die *in vivo* Fluoreszenzanalysen zeigten keine Abweichung der Mutanten zum Wildtyp. Dazu wurden Vero Zellen 14 h nach Infektion durch indirekte Immunfluoreszenz mit Hilfe eines UL34 spezifischen Antikörpers zusammen mit einem Lamin A/C spezifischen Antikörper analysiert. Alle UL34 Mutanten wiesen eine dem Wildtyp entsprechende Lokalisation an der Kernperipherie vergleichbar mit Lamin A/C auf (Abb. 4.6 B).

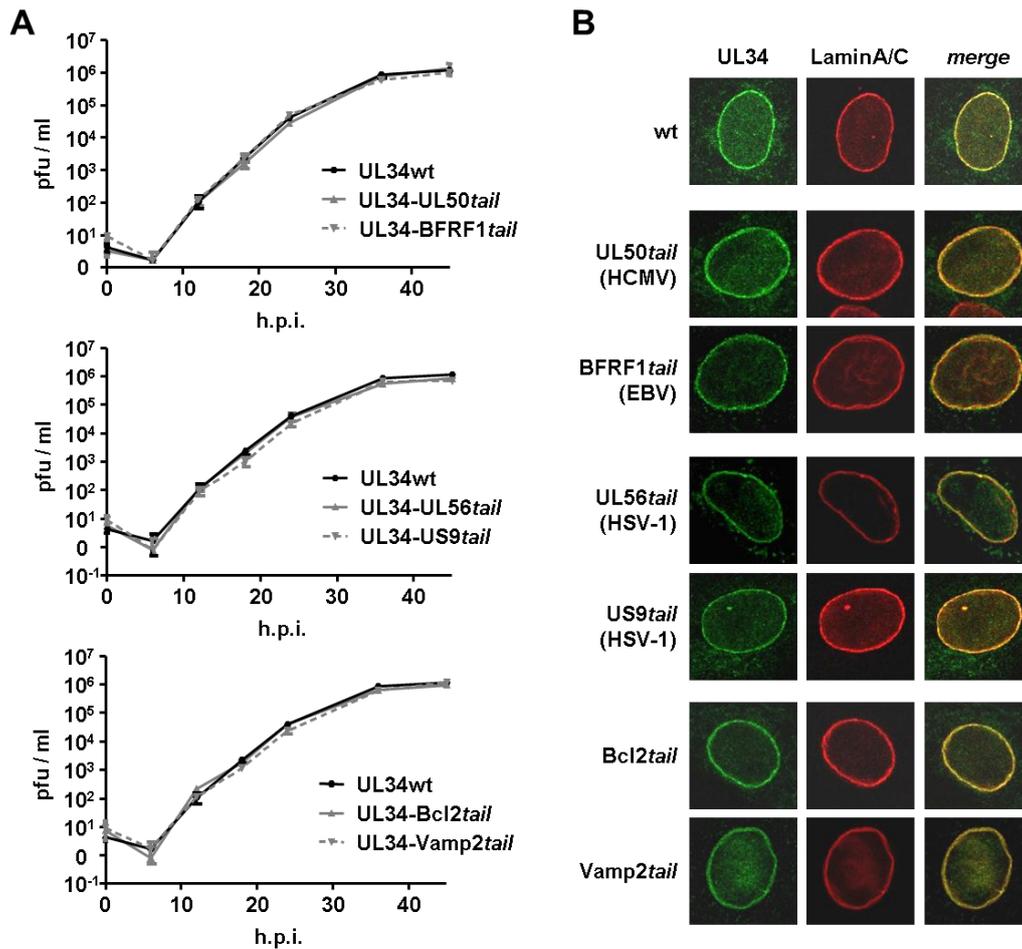


Abbildung 4.6: Analyse der HSV-1 UL34 BAC Mutanten mit TA-Permutationen

Die Ergebnisse sind in drei Gruppen jeweils verglichen mit HSV-1 UL34wt zusammengefasst: UL34 Mutanten mit orthologen TA-Permutationen (oben), UL34 Mutanten mit heterologen HSV-1 TA-Permutationen (Mitte) und UL34 Mutanten mit zellulären TA-Permutationen (unten). **A)** Zur Bestimmung der Wachstumskinetiken wurden Vero Zellen in Triplikaten mit den rekombinanten Viren infiziert (MOI 0,1), der Kulturüberstand an mehreren Zeitpunkten nach Infektion (h.p.i.) abgenommen und der jeweilige Virustiter (pfu/ml) mittels *Plaque Assay* bestimmt. **B)** Vero Zellen wurden mit den entsprechenden Viren infiziert und nach 14 h die subzelluläre Lokalisation von UL34wt sowie den TMD-Permutationsmutanten durch indirekte Immunfluoreszenz unter Verwendung eines polyklonalen anti-UL34 und monoklonalen anti-Lamin A/C Antikörpers analysiert.

Der Austausch des *tail anchors* von UL34 mit denen von herpesviralen und zellulären TA-Proteinen hatte demnach weder einen Einfluss auf die Lokalisation von UL34 bzw. des NEC an der Kernhülle noch auf dessen Funktion, da die Virusreplikation bei allen Mutanten völlig normal verlief. Folglich deuten die Ergebnisse darauf hin, dass UL34 verschiedene TA mit Sequenz- und vor allem Hydrophobizitätsunterschieden tolerieren kann.

Alle Transmembrandomänen der untersuchten TA-Proteine bilden eine α -helikale Struktur aus. Im nächsten Schritt sollte deshalb untersucht werden, ob die Funktion von UL34 auch durch einen alternativen, nicht- α -helikalen Verankerungsmechanismus komplementiert werden kann. Die Assoziation von Proteinen mit der inneren Kernhülle kann durch diverse

Mechanismen erfolgen. Prelamin A (Prelamin A), der Vorläufer von Lamin A, ist eine der Hauptkomponenten der Kernlamina und enthält am C-Terminus ein für die Verankerung essentielles CAAX-Motiv (Corrigan *et al.*, 2005). Für den Einbau in die Lamina sind eine Reihe von post-translationalen Modifikationen am CAAX-Motiv einschließlich Isoprenylierung und Carboxy-Methylierung vonnöten. Als Folge kommt es zu einer endoproteolytischen Spaltung bei Aminosäure 646, wodurch schließlich reifes Lamin A entsteht (Abb. 4.7 A).

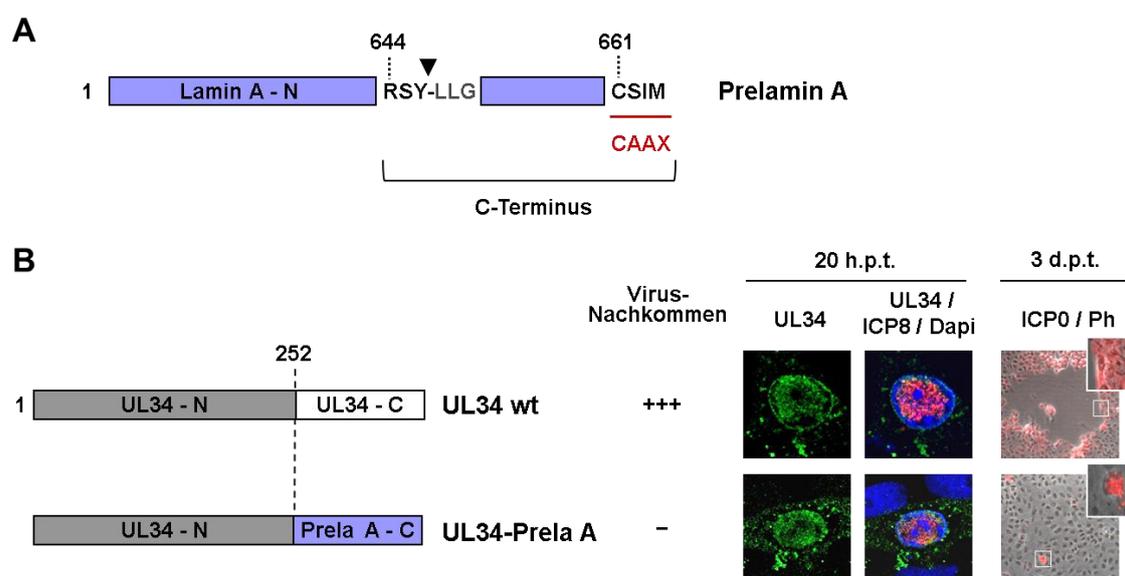


Abbildung 4.7: UL34 TA-Austausch mit dem Verankerungsmechanismus von Lamin A

A) Schematische Darstellung von Prelamin A (Prelamin A), dem Vorläufer von Lamin A. Die Verankerung von Prelamin A in der INM erfordert eine Reihe von post-translationalen Modifikationen am C-terminalen CAAX-Motiv sowie eine endoproteolytische Spaltung nach As. 646 (durch einen schwarzen Pfeil gekennzeichnet), wobei schließlich reifes Lamin A entsteht. **B)** Der UL34 TA wurde durch den Lamin A spezifischen Verankerungsmechanismus ausgetauscht, indem 20 Aas. der C-terminalen Domäne von Prelamin A (einschließlich des CAAX-Motivs und der Spaltstelle) an die N-terminale Domäne von UL34 fusioniert wurden. Anschließend wurde diese Mutante mittels BAC Mutagenese in den Δ UL34/*gk* BAC eingesetzt und im Vergleich zum UL34wt BAC analysiert. Die Fähigkeit zur Produktion von Virus-Nachkommen wurde durch Transfektion der mutierten BAC DNA in Vero Zellen untersucht (3 d.p.t.). Die Expression und subzelluläre Lokalisation der HSV-1 UL34-Prelamin A Mutante wurde durch indirekte Immunfluoreszenz Analyse nach 20 h BAC DNA Transfektion (20 h.p.t.) in Vero Zellen mittels polyklonalem anti-UL34 und monoklonalem anti-ICP8 Antikörper (rot) überprüft. Die Zellkerne wurden dabei durch Dapi-Färbung (blau) visualisiert. Zur Analyse der potentiellen *Plaquebildung* wurden Vero Zellen mit BAC DNA transfiziert und nach 3 Tagen (3 d.p.t.) mittels indirekter Immunfluoreszenz unter Verwendung eines monoklonalen anti-ICP0 Antikörpers ausgewertet. ICP0-positive Zellen sind rot dargestellt und mit dem Phasenkontrast (Ph) überlagert.

Kürzlich wurde berichtet, dass HSV-1 UL34 mit Lamin wie auch mit Emerin interagiert (Reynolds *et al.*, 2004; Leach *et al.*, 2007; Mou *et al.*, 2008). Daher wäre es denkbar, dass es einen analogen Weg für die Zielsteuerung zur INM verwenden könnte. Um dies zu testen, wurde eine BAC Mutante generiert, bei welcher der UL34 *tail anchor* (As. 252-275) mit dem C-Terminus von Prelamin A, d.h. mit den letzten 20 Aminosäuren ersetzt wurde. Diese UL34-Prelamin A Mutante enthält das beschriebene CAAX-Motiv sowie die endoproteolytische Spaltstelle, jedoch keine α -helikale TMD. Die anschließende Virus-Rekonstitution, d.h. die

Produktion von Virus-Nachkommen, wurde durch Transfektion der mutierten BAC DNA in Vero Zellen untersucht, wobei bei der HSV-1 UL34-PrelaA Mutante im Gegensatz zum HSV-1 UL34 wt kein zytopathischer Effekt beobachtet werden konnte (Abb. 4.7 B links). Dies wurde durch die Analyse der *Plaquebildung* mittels indirekter Immunofluoreszenz nach drei Tagen Transfektion (3 d.p.t.) in Vero Zellen bestätigt, da auch hier keine effiziente Virusausbreitung bei der HSV-1 UL34 BAC Mutante sichtbar war, während die *Plaquebildung* für den Wildtyp BAC gut erkennbar war (Abb. 4.7 B rechts). Um sicher zu gehen, dass UL34-Prela A exprimiert wird sowie dessen subzelluläre Lokalisation zu bestimmen, wurde nach 20 h BAC Transfektion (20 h.p.t.) von Vero Zellen eine *in vivo* Fluoreszenzanalyse durchgeführt. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Expression des mutierten UL34 vergleichbar zum Wildtyp Protein war und dass es nun hauptsächlich nukleoplasmatisch vorliegt mit einem geringen cytoplasmatischen Anteil, jedoch ohne einer Wildtyp-ähnlichen Kernhüllenfärbung (Abb. 4.7 mitte). Demzufolge führt der Austausch des UL34 *tail anchors* mit dem INM-Verankerungsmechanismus von Lamin A zu einer Mutante, welche zwar eine Kernlokalisierung aufweist, jedoch nicht mehr in der Lage ist, stabil in der Kernmembran verankert zu werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse dieser ausführlichen TMD-Permutationsanalyse deutlich zeigen, dass der *tail anchor* von UL34 ohne Beeinträchtigung der Virusreplikation mit den entsprechenden Regionen von anderen TA-Proteinen ersetzt werden kann, die sowohl unterschiedliche Funktionen als auch Bestimmungsorte innerhalb der Zelle besitzen. Folglich scheint UL34 für seine Funktion während des Kernausswanderungsprozesses der Capside TMD mit abweichenden Sequenzen und Hydrophobizitäten zu tolerieren. Durch den Austausch mit einem alternativen INM-Verankerungsmechanismus, welcher keine α -helikale TMD enthält, konnte die virale Funktion jedoch nicht mehr komplementiert werden.

4.1.4. Analyse der TMD-flankierenden positiven Ladungen von UL34

Mehrere Studien über zelluläre *tail anchor* Proteine berichteten, dass TMD-flankierende positiv-geladene Sequenzbereiche entscheidend für die Zielsteuerung des Proteins zu seiner Zielmembran sein können (Borgese *et al.*, 2003; Kaufmann *et al.*, 2003; Borgese *et al.*, 2007). Auch HSV-1 UL34 enthält in seiner kurzen luminalen Domäne eine einzelne sowie auf der amino-terminalen Seite der TMD mehrere positive Ladungen. Es konnte mit der bereits analysierten Mutante HSV-1 UL34s269 (As. 1-269), in welcher drei Aminosäuren der TMD und auch die kurze luminalen Region mit einem basischen Argininrest entfernt wurden, schon gezeigt werden, dass die positive Ladung auf der luminalen Seite für die Zielsteuerung zur Kernperipherie und für die generelle Funktion von UL34 nicht benötigt wird (siehe Abschnitt 4.1.2). Um herauszufinden, ob die amino-terminal sich befindenden basischen Aminosäuren eine relevante Rolle dabei spielen, wurde dieser Bereich (As. 236-251) mittels BAC

Mutagenese deletiert. Durch Transfektion der resultierenden BAC DNA in Vero Zellen wurden die entsprechenden Viren rekonstituiert (Abb. 4.8 A). Mit der anschließenden Analyse der HSV-1 UL34 Δ 236-251 Mutante durch Infektion von Vero Zellen konnte gezeigt werden, dass diese keinen Unterschied zum UL34 wt sowohl in ihrer Wachstumskinetik (Abb. 4.8 B) als auch in der Lokalisation an der Kernperipherie aufwies (Abb. 4.8 C).

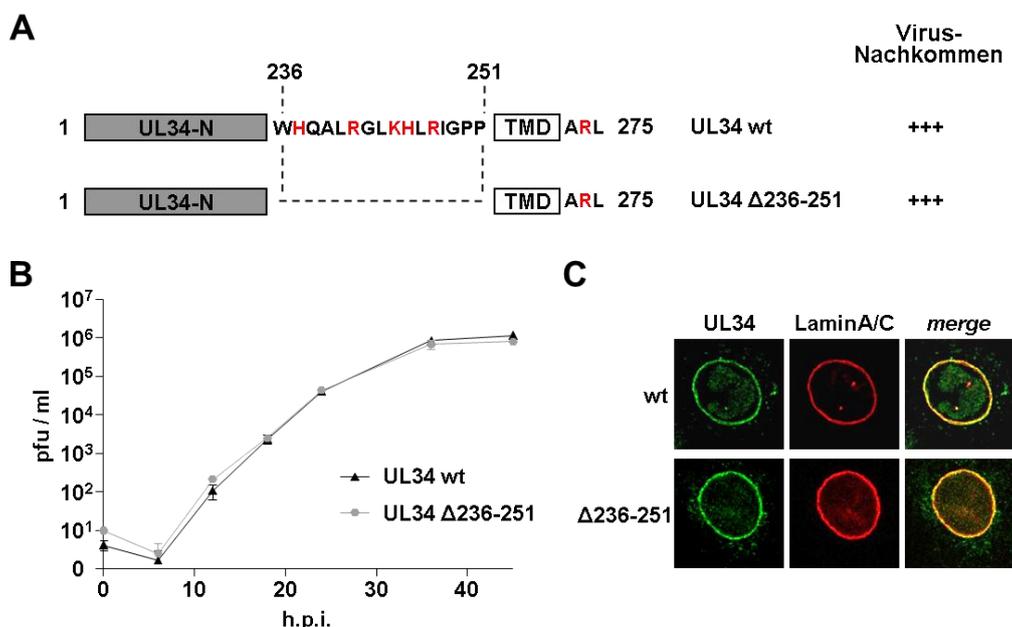


Abbildung 4.8: Analyse der TMD-flankierenden positiven Ladungen von HSV-1 UL34

A) Die Aminosäuresequenzen der TMD-flankierenden Bereiche von UL34 sind graphisch dargestellt (rot = basische Reste). Bei der BAC Mutante HSV-1 UL34 Δ 236-251 wurden die N-terminal liegenden Ladungen durch die Deletion von As. 236 bis 251 entfernt. Die Fähigkeit zur Virus-Rekonstitution, d.h. Virus-Nachkommen zu produzieren, ist rechts angegeben. **B)** Für Wachstumskinetiken wurden Vero Zellen mit mutiertem Virus bzw. Wildtyp Virus in Triplikaten infiziert (MOI 0,1), anschließend der Kulturüberstand zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion (h.p.i.) abgenommen und der Virustiter (pfu/ml) mittels *Plaque Assay* bestimmt. **C)** Die subzelluläre Lokalisation von UL34 wurde durch indirekte Immunofluoreszenz nach 14 h Infektion in Vero Zellen unter Verwendung eines polyklonalen anti-UL34 und monoklonalen anti-Lamin A/C Antikörpers untersucht.

Somit sind vermutlich weder die nukleoplasmatischen Ladungen noch die luminal positiv-geladene Domäne des UL34 *tail anchors* für die Zielsteuerung zur INM und für die generelle Funktion des Proteins wichtig.

4.2. Kerntransport der NEC-Proteine von HSV-1

Die essentiellen Proteine UL31 und UL34 von HSV-1 bilden gemeinsam den Kernausswanderungskomplex (NEC), wofür eine nukleäre Lokalisation beider Proteine benötigt wird. Auch die kürzlich beschriebenen zusätzlichen Rollen von UL31 und orthologen Proteinen für die optimale NF κ B-Aktivierung und virale Genexpression in der frühen Phase der Infektion sowie beim *DNA packaging* Prozess während der Capsidreifung setzen eine Ansammlung des Proteins im Zellkern voraus (Granato *et al.*, 2008; Popa *et al.*, 2010; Roberts und Baines, 2011). Wie jedoch UL31 und UL34 in den Zellkern gelangen und in welchem Kompartiment der NEC schließlich gebildet wird, ist bis jetzt noch unbekannt. Frühere Daten von UL31 orthologen Proteinen aus HSV-2 und MCMV weisen darauf hin, dass UL31 über einen aktiven Rezeptor-vermittelten Import in den Zellkern transportiert wird (Zhu *et al.*, 1999; Yamauchi *et al.*, 2001; Lotzerich *et al.*, 2006). Die Vorhersage eines klassischen Kernlokalisierungssignals (NLS) innerhalb der N-terminalen Domäne von HSV-1 UL31 sowie HSV-1 UL34 mit Hilfe von bioinformatischen Methoden unterstützt diese Vermutung. Im Folgenden sollen nun die identifizierten Kernlokalisierungssignale im viralen Kontext auf ihre Funktion untersucht werden, um erste detaillierte Erkenntnisse über den Kerntransport der NEC-Proteine zu erlangen. Dazu wurden jeweils gezielt Mutationen innerhalb der beiden NLS Konsensus-Sequenzen eingeführt und mittels BAC Mutagenese entsprechende HSV-1 NLS Mutanten hergestellt. Diese wurden einzeln auf funktionale Komplementation und subzelluläre Lokalisation der NEC-Proteine untersucht. Zusätzlich wurde eine HSV-1 Doppelmutante generiert, welche beide NLS Mutationen sowohl im UL31 als auch im UL34 Genprodukt enthält.

4.2.1. Funktionale Analyse der NLS Sequenz von HSV-1 UL34

Im Vorfeld wurde mittels bioinformatischer Berechnungen für HSV-1 UL34 eine klassische bipartite NLS Sequenz zwischen As. 177 und 195 vorhergesagt. Diese wurde in Kooperationsarbeit auf ihre Funktionalität in Abwesenheit von anderen viralen Proteinen untersucht. Zum einen konnte durch die Fusion der putativen NLS von UL34 an ein EYFP demonstriert werden, dass diese allein ausreicht, um ein inertes, normalerweise cytoplasmatisch lokalisiertes Protein in den Zellkern zu transportieren. Außerdem zeigten Y2H-Interaktionsstudien, dass UL34 über die identifizierte Sequenz spezifisch an drei verschiedene humane Importin α -Rezeptoren bindet, da nach Einführung von gezielten Mutationen innerhalb der NLS Konsensus-Sequenz diese Interaktionen nicht mehr ausgebildet werden konnten. Dabei wurden bei der NLS-Mutante (NLSmt) im zweiten Cluster der bipartiten NLS Sequenz drei aufeinanderfolgende basische durch neutrale Aminosäuren (Arginin zu Asparagin) ersetzt (Raschbichler, 2011).

4.2.1.1. Die UL34 NLS ist für die Virusreplikation nicht essentiell

Um nun im nächsten Schritt herauszufinden, welche Rolle die identifizierte NLS von UL34 während der Virusreplikation bezüglich Lokalisation und Funktion der NEC Proteine spielt, wurden mittels BAC Mutagenese, wie unter Abschnitt 4.1.1 beschrieben, eine HSV-1 UL34 NLS Mutante hergestellt. Nach Transfektion der HSV-1 BAC Mutante konnte eine zum Wildtyp vergleichbare Virus-Rekonstitution beobachtet werden, so dass der letale Phänotyp des HSV-1 Δ UL34/*gk* BAC funktional komplementiert wurde (Abb. 4.9).

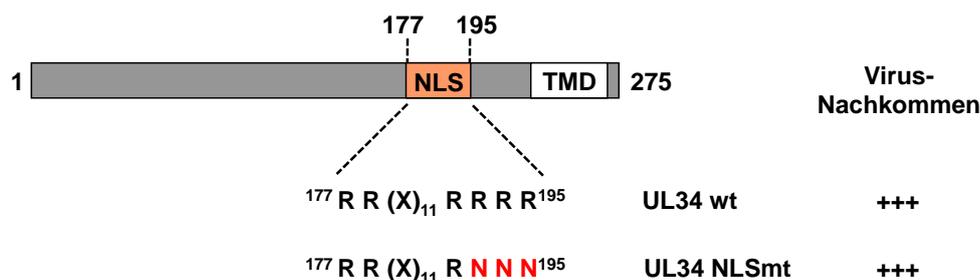


Abbildung 4.9: Virus-Rekonstitution der HSV-1 UL34 NLS Mutante

Schematische Darstellung der potentiellen bipartiten klassischen NLS von UL34wt (As. 177-195) und einer UL34 NLS Mutante (UL34 NLSmt). Der Austausch von basischen Argininresten gegen Asparagin- oder Alaninreste innerhalb der NLS Konsensus-Sequenz erfolgte mittels zielgerichteter Mutagenese. Mittels BAC Mutagenese wurde eine entsprechende HSV-1 UL34 NLS Mutante hergestellt und deren Fähigkeit zur Virus-Rekonstitution und Produktion von Virus-Nachkommen durch Transfektion der mutierten BAC DNA in Vero Zellen untersucht (3 d.p.t.).

Eine zusätzliche *Plaquesanalyse* mittels indirekter Immunofluoreszenz, bei welcher die gebildeten *Plaques* 3 d.p.t. angefärbt wurden, bestätigte diese Beobachtung, da einzelne *Plaques* und somit eine Wildtyp-ähnliche Virusausbreitung bereits gut sichtbar waren (Abb. 4.10 A). Zur Charakterisierung der Wachstumseigenschaft dieser HSV-1 UL34 NLS Mutante im Vergleich zum Wildtyp wurden Vero Zellen mit den rekombinanten Viren infiziert und über einen Zeitraum von 45 h mehrmals die Anzahl der infektiösen Viruspartikel im Kulturüberstand bestimmt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die UL34 NLS Mutation nur zu einer leichten Beeinträchtigung der herpesviralen Replikation führte, wobei erst nach 18 h eine Reduktion der Virusproduktion um etwa eine halbe *log* Stufe im Vergleich zum UL34 wt beobachtet werden konnte (Abb. 4.10 B). Da dieser Unterschied jedoch sehr gering ist, kann man nicht ausschließen, dass es sich dabei um messtechnische Schwankungen handelt. Mittels indirekter Immunofluoreszenz Analyse konnte hingegen 14 h nach Infektion eindeutig gezeigt werden, dass UL34 trotz mutierter NLS genauso wie Wildtyp UL34 in der Lage war an der Kernperipherie vergleichbar mit Lamin A/C zu lokalisieren. Auch für den NEC-Partner UL31 konnte mit Hilfe eines UL31 spezifischen Antikörpers eine Lamin A/C-ähnliche korrekte Kernhüllenfärbung beobachtet werden (Abb. 4.10 C).

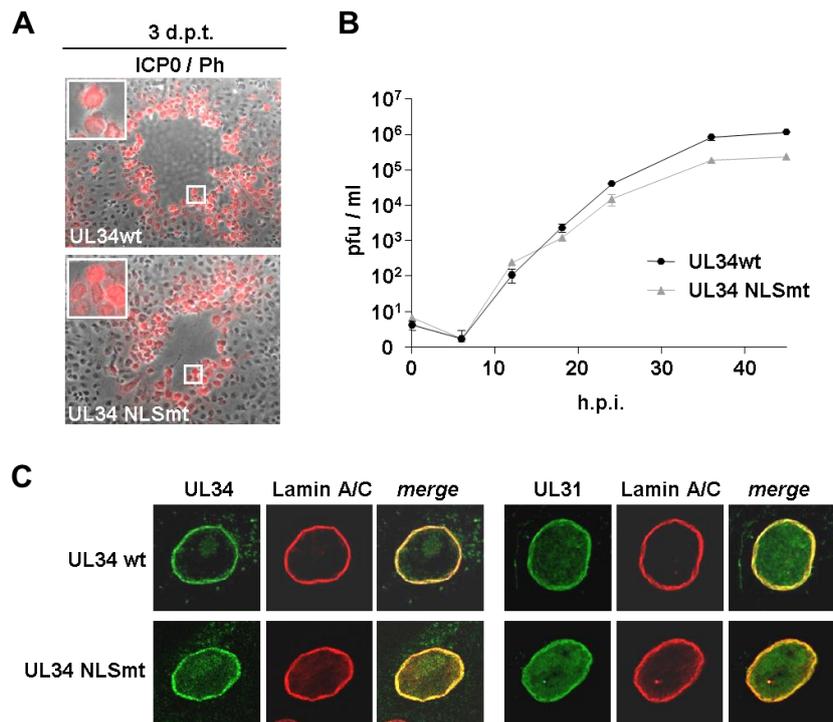


Abbildung 4.10: Funktionale Analyse der HSV-1 UL34 NLS Mutante

A) Für die Analyse der *Plauebildung* wurden Vero Zellen mit BAC DNA transfiziert und nach 3 Tagen (3 d.p.t.) mittels indirekter Immunfluoreszenz mit Hilfe eines monoklonalen anti-ICP0 Antikörpers angefärbt und ausgewertet. ICP0-positive Zellen sind rot dargestellt und mit dem Phasenkontrast (Ph) überlagert. **B)** Zur Bestimmung der Wachstumseigenschaften der HSV-1 UL34 NLSmt im Vergleich zum Wildtyp wurden Vero Zellen mit rekombinanten Viren in Triplikaten infiziert (MOI 0,1), der Kulturüberstand zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion (h.p.i.) abgenommen und der jeweilige Virustiter (pfu/ml) mittels *Plaue Assay* bestimmt. **C)** Die subzelluläre Lokalisation von UL34wt sowie der UL34 NLSmt wurde durch indirekte Immunfluoreszenz 14 h nach Infektion von Vero Zellen mit den entsprechenden rekombinanten Viren unter Verwendung eines polyklonalen anti-UL34 und monoklonalen anti-Lamin A/C Antikörpers analysiert. Die Lokalisation des NEC-Partners UL31 wurde durch einen polyklonalen anti-UL31 Antikörper analog detektiert.

Es scheint somit, dass die identifizierte NLS von HSV-1 UL34 für die nukleäre Lokalisation beider NEC-Proteine nicht essentiell ist und auch kaum Auswirkungen auf den *nuclear egress* der Capside bzw. auf den herpesviralen Replikationszyklus im generellen hat. Daher muss der Kernimport von UL34 hauptsächlich durch einen alternativen redundanten Mechanismus oder in Abhängigkeit von einem anderen, in den Zellkern importierten Protein erfolgen. Ob dafür UL31 verantwortlich gemacht werden kann, soll im Folgenden durch dessen NLS Analyse untersucht werden.

4.2.2. Funktionale Analyse der NLS Sequenz von HSV-1 UL31

Für das HSV-1 UL31 Protein wurde mit Hilfe von bioinformatischen Methoden eine klassische bipartite NLS vorhergesagt, welche aus zwei Clustern von basischen Arginin- oder Lysinresten besteht. Diese erstreckt sich über die Aminosäuren 21 bis 42 innerhalb der N-terminalen variablen Domäne und ist konserviert auch in anderen herpesviralen Orthologen vorhanden.

4.2.2.1. Die UL31 NLS ist für den Kernimport funktional und essentiell

Zuerst wurde dieses potentielle NLS Motiv auf seine funktionale Aktivität bezüglich des Kernimports in Abwesenheit von anderen viralen Proteinen charakterisiert. Dazu wurden drei UL31 NLS Mutanten (NLSmt) hergestellt, bei welchen verschiedene basische Argininreste gegen neutrale Asparagin- oder Alaninreste innerhalb der NLS Konsensus-Sequenz mittels zielgerichteter Mutagenese ausgetauscht wurden. Die UL31 NLSmt 1 enthält dabei drei aufeinanderfolgende Austausche im ersten Cluster der bipartiten NLS Sequenz, wohingegen bei der UL31 NLSmt 2 drei Aminosäuren im zweiten Cluster ersetzt wurden. Die UL31 NLSmt 3 schließlich besteht aus einer Kombination beider NLS Mutanten, d.h. sowohl das erste als auch das zweite Cluster der NLS Sequenz wurde mutiert (Abb. 4.11 A). Diese UL31 NLS Mutanten wie auch UL31 wt wurden in Y2H *prey* Vektoren kloniert und auf Interaktion mit Y2H *bait* Vektoren getestet, die für drei verschiedene humane Importin α -Rezeptoren (Imp α 1,3 und 6) kodieren. Dabei konnte für UL31 wt, das die gesamte potentielle NLS beinhaltet, eine starke Interaktion mit den Transportrezeptoren im Y2H Assay gezeigt werden, da diploide Hefezellen, welche UL31 wt und Imp α 1, 3 oder 6 exprimierten, uneingeschränkt in der Lage waren, auf Selektivmedium zu wachsen. Eine nahezu Wildtyp-ähnliche Wechselwirkung wurde auch noch für die UL31 NLSmt 1 beobachtet. Im Gegensatz dazu konnten die UL31 NLS Mutanten 2 und 3 an keinen der drei Transportrezeptoren mehr binden (Abb. 4.11 B). Dies spricht für eine spezifische und NLS-abhängige Interaktion, wofür hauptsächlich das zweite basische Cluster der bipartiten NLS verantwortlich ist. Alle weiteren Experimente wurden ausschließlich mit der UL31 NLSmt 3 durchgeführt, welche im Folgenden als UL31 NLSmt bezeichnet wird.

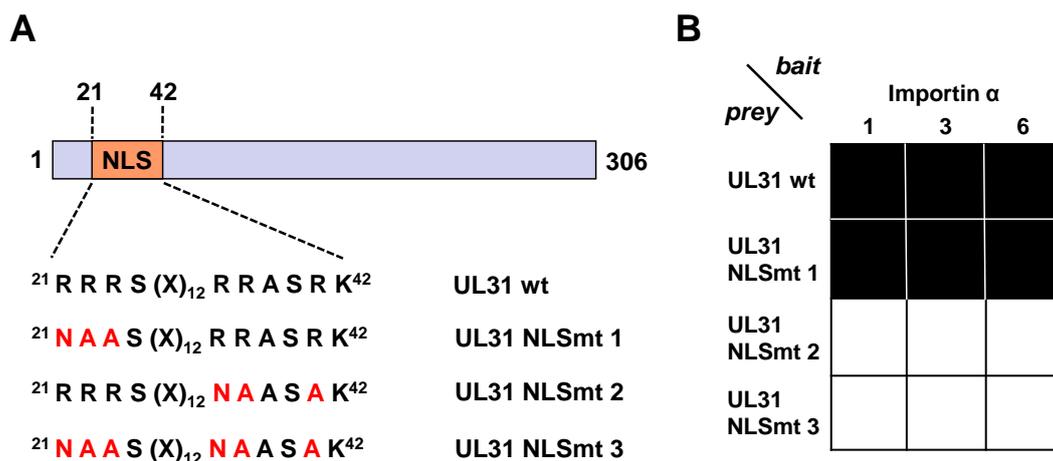


Abbildung 4.11: HSV-1 UL31 interagiert mit Importin α -Rezeptoren über eine bipartite NLS

A) Schematische Darstellung von UL31 Wildtyp (UL31wt) und UL31 NLS Mutanten (UL31 NLSmt). Der Austausch von basischen Argininresten gegen Asparagin- oder Alaninreste innerhalb der NLS Konsensus-Sequenz erfolgte mittels zielgerichteter Mutagenese. **B)** Die Interaktionen von UL31wt und NLS Mutanten mit Importin α 1, 3 und 6 wurden mit Hilfe der Y2H-Methode getestet (schwarzes Feld = positive Interaktion, weißes Feld = keine Interaktion).

Die NLS von UL31 wurde auf weitere für eine funktionale NLS wichtige Kriterien wiederum in Kooperationsarbeit getestet. Dabei konnte gezeigt werden, dass ein Transfer der putativen NLS von UL31 auf ein inertes, cytoplasmatisches Protein ausreicht, um das Fusionsprotein in den Zellkern zu translozieren. Ebenso ist die NLS Sequenz für den Kernimport von UL31 in Abwesenheit von anderen viralen Proteinen essentiell, da nach transienter Transfektion die UL31 NLSmt im Gegensatz zum Wildtyp eine hauptsächlich cytoplasmatische Mislokalisierung aufwies. Durch Fusion einer klassischen SV40 NLS an den N-Terminus der UL31 NLSmt konnte der Import in den Zellkern jedoch wiederhergestellt werden (Raschbichler, 2011). Folglich erfüllt die identifizierte NLS Sequenz von UL31 alle wichtigen Kriterien einer funktionalen NLS, so dass diese als nächstes im viralen Kontext untersucht werden sollte, um herauszufinden, ob sie auch in Anwesenheit von anderen viralen Faktoren eine essentielle Funktion für den Kerntransport von UL31 und eventuell auch UL34 übernimmt.

4.2.2.2. Herstellung von HSV-1 UL31 NLS Mutanten

Alle verwendeten HSV-1 UL31 Mutanten wurden über eine modifizierte *galk*-kan positiv/negativ-Selektionsmutagenese des BAC HSV-1 (17⁺)lox in *E. coli* hergestellt. Im HSV-1 Genom liegt die kodierende Sequenz von UL31 im Bereich von 81749 bp bis 82669 bp und weist einen 56 bp langen Überlappungsbereich mit UL30 am 3' Ende sowie eine 8 bp lange gemeinsame Region mit UL32 am 5' Ende von UL31 auf. Um eine Beeinträchtigung der offenen Leseraster von UL30 und UL32 zu verhindern, wurde nur der nicht überlappende Bereich von UL31 (Nukleotide 9 bis 865) durch die *galk*-kan (*gk*) Kassetten mittels homologer Rekombination ersetzt, wodurch eine Δ UL31/*gk* Mutante entstand, welche als UL31 Deletionsmutante diente (Abb. 4.12 oben). Der anschließende Austausch des Selektionsmarkers mit einem UL31 wt Gen führte zum BAC HSV-1(17⁺)lox UL31 *rescue*, welcher als Wildtyp verwendet wurde (Abb. 4.12 A). Auf dieselbe Weise wurde auch ein Fragment, welches die UL31 NLSmt enthält, in das BAC HSV-1 (17⁺)lox Δ UL31/*gk* eingesetzt, wodurch das BAC HSV-1(17⁺)lox UL31 NLSmt entstand. Aus diesem wurde zusätzlich eine Revertante hergestellt, indem zuerst die *galk*-kan Kassetten und anschließend ein UL31 wt Gen reinsertiert wurde (Abb. 4.12 B). Für die Insertion einer UL31 NLSmt mit einer N-terminal fusionierten SV40 NLS in das BAC HSV-1 (17⁺)lox Δ UL31/*gk* wurde die Überlappungssequenz mit UL32 (ersten 8 bp von UL31) dupliziert, um das UL32 Genprodukt unverändert zu erhalten. Zusätzlich wurde durch eine eingeführte Punktmutation das authentische UL31 Startcodon stillgelegt, ohne die kodierende Sequenz von UL32 am 3' Ende zu verändern. Somit folgt nun in diesem BAC nach dem Stopcodon von UL32 unmittelbar die kodierende Sequenz für das SV40 NLS-UL31 NLSmt Gen. Die entsprechende Revertante enthält immer noch den duplizierten Überlappungsbereich mit UL32 sowie die eingeführte Punktmutation am originalen UL31 Startcodon (Abb. 4.12 C).

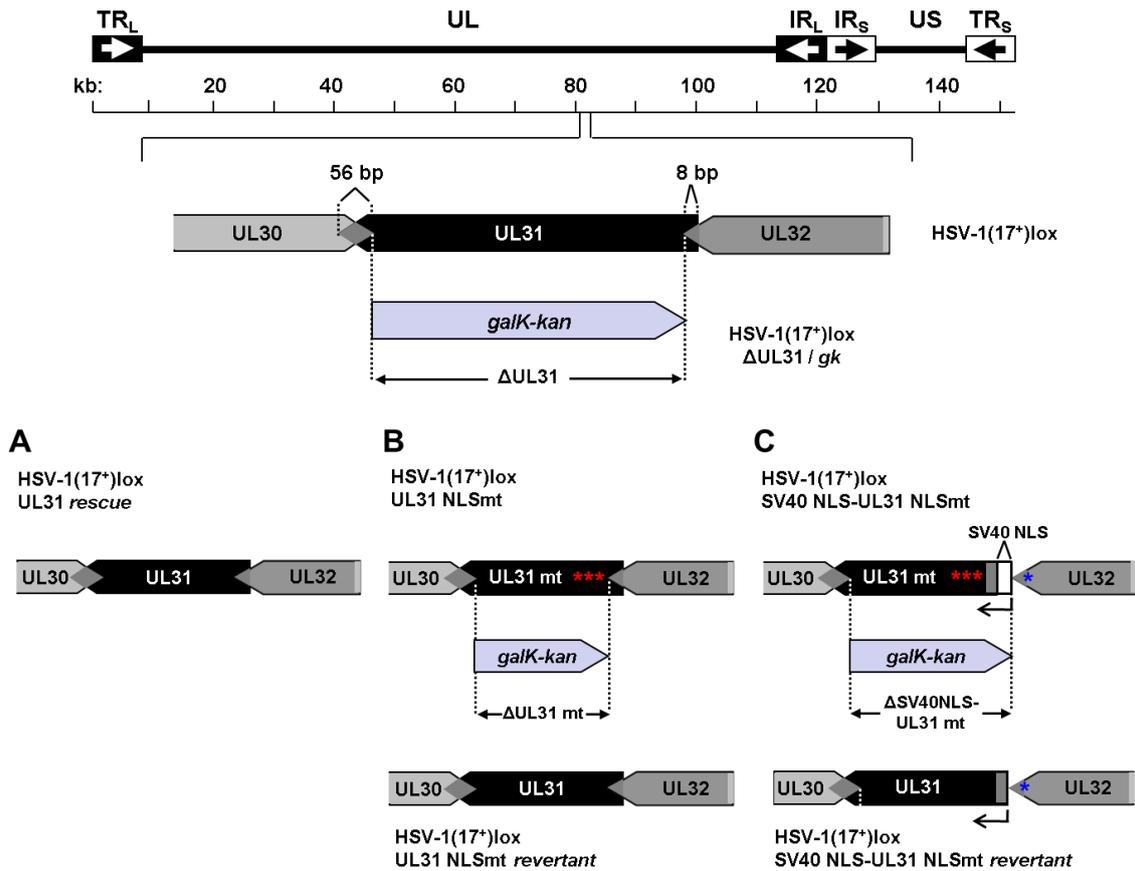


Abbildung 4.12: Herstellung von HSV-1 UL31 NLS Mutanten mittels BAC Mutagenese

Die schematische Darstellung des HSV-1(17⁺)lox Genoms zeigt die *unique long* (UL) and *unique short* (US) Regionen, welche von *terminal* (TR_L und TR_S) und *internal* (IR_L und IR_S) repeats flankiert werden. Die Zahlen geben die Position in Kilobasenpaaren (kb) an. Der offene Leserahmen (ORF) von UL31 und benachbarten Genen (als Pfeile) sowie deren Überlappungsbereiche (in bp) sind gekennzeichnet. Die BAC Mutagenese wurde nach einem modifizierten *galk-kan* positiv/negativ-Selektionsprinzip durchgeführt. Zuerst wurde der nicht überlappende Bereich von UL31 (Nukleotide 9 bis 865) durch die *galk-kan* (*gk*) Kassetten mittels homologer Rekombination ersetzt, wodurch eine Δ UL31/*gk* Mutante entstand. Dann wurde diese wieder durch Fragmente einer UL31 NLS Mutante ausgetauscht, welche durch PCR Amplifikation mit den entsprechenden UL31mt Plasmiden als *Template* und Primern mit flankierenden homologen Sequenzen generiert wurden. NLS Mutationen sind als rote Sterne markiert, während das mutierte UL31 Startcodon als blauer Stern gekennzeichnet ist. **A)** Durch Austausch mit einem UL31wt Gen entstand das BAC HSV-1(17⁺)lox UL31 *rescue*. **B)** Aus dem durch Substitution mit einem UL31 NLSmt Fragment generierten BAC wurde eine Revertante hergestellt, indem zuerst die *galk-kan* Kassetten und anschließend ein UL31wt Fragment reinsertiert wurde. **C)** Für die Insertion einer UL31 NLSmt mit einer N-terminal fusionierten SV40 NLS wurde die Überlappungssequenz mit UL32 (ersten 8 bp von UL31) dupliziert und durch eine Punktmutation das authentische UL31 Startcodon stillgelegt, ohne die kodierende Sequenz von UL32 am 3' Ende zu verändern. Die entsprechende Revertante enthält die eingeführte Sequenzduplikation sowie die Punktmutation.

Alle hierfür verwendeten *Templates* und Oligonukleotide sind unter Material und Methoden in den Tabellen 3.7 und 3.15 aufgeführt. Die hergestellten BAC Mutanten wurden mittels Restriktionsanalyse (*Mlu*I-Verdau) und Sequenzierung des UL31 Lokus auf korrekte Insertion und Sequenz überprüft.

4.2.2.3. Die UL31 NLS enthält eine für die Virusreplikation essentielle Funktion

Die Virus-Rekonstitution nach Transfektion der generierten BAC DNA in Vero Zellen wurde nach drei Tagen durch das Auftreten von zytopathischen Effekten beobachtet. Eine zusätzliche *Plaquesanalyse* mittels indirekter Immunofluoreszenz, bei welcher die potentiell gebildeten *Plaques* 3 d.p.t. angefärbt wurden, diente zur Bestätigung (Abb. 4.13).

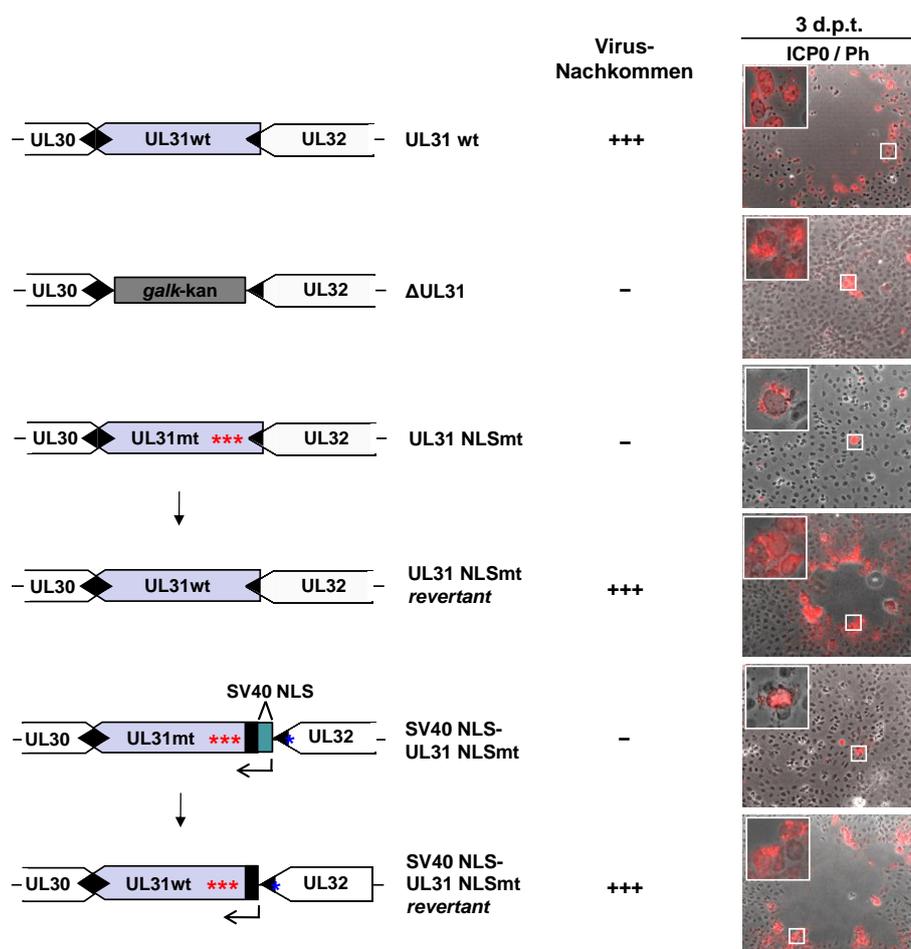


Abbildung 4.13: Virus-Rekonstitution der HSV-1 UL31 NLS Mutanten

Die Fähigkeit zur Virus-Rekonstitution bzw. Produktion von Virus-Nachkommen nach Transfektion der mutierten BAC DNA (durch Sterne markiert) in Vero Zellen ist für alle HSV-1 UL31 NLS BAC Mutanten dargestellt. Um die mögliche *Plaquesbildung* zu untersuchen, wurden Vero Zellen mit BAC DNA transfiziert und 3 d.p.t. eine indirekte Immunofluoreszenz mit einem monoklonalen anti-ICP0 Antikörper durchgeführt. ICP0-positive Zellen sind rot dargestellt und mit dem Phasenkontrast (Ph) überlagert.

Wie zu erwarten war die UL31 Deletionsmutante Δ UL31/*gk* nicht lebensfähig, d.h. sie war nicht in der Lage, effizient Nachkommen-Viren zu bilden, so dass der Kulturüberstand keine infektiösen Viruspartikel enthielt. Für die funktionale Charakterisierung der UL31 NLS im viralen Kontext wurde zuerst die Fähigkeit der hergestellten Mutanten zur Komplementation des HSV-1 Δ UL31/*gk* BAC untersucht. Dabei konnten für den UL31 Wildtyp BAC eindeutige *Plaquesbildungen* beobachtet werden, die auf eine erfolgreiche Virus-Rekonstitution

schließen lassen. Dagegen war der HSV-1 UL31 NLSmt BAC nicht in der Lage, durch effiziente Virusreplikation Nachkommen-Viren zu produzieren, da keine zytopathischen Effekte wie die Ausbildung von *Plaques* beobachtet werden konnten. Erstaunlicherweise gilt dies auch für den SV40 NLS-UL31 NLSmt BAC. Obwohl bei transienter Expression von UL31 durch Fusion einer SV40 NLS Sequenz in Abwesenheit von anderen viralen Faktoren der Kernimport der UL31 NLSmt wiederhergestellt werden konnte, wurde der letale Phänotyp der UL31 NLSmt dadurch im Viruskontext nicht repariert. Um sicher zu gehen, dass dieser Phänotyp nur auf die eingeführte UL31 NLS Mutation zurückzuführen ist und nicht durch zusätzliche unerwünschte Rekombinationsereignisse im HSV-1 Genom entstanden ist, wurden entsprechende Revertanten sowohl von der HSV-1 UL31 NLSmt als auch von der HSV-1 SV40 NLS-UL31 NLSmt hergestellt. Nach Transfektion der BAC DNA beider Revertanten konnte schließlich eine zum UL31 Wildtyp vergleichbare Virus-Rekonstitution sowie *Plaquebildung* beobachtet werden, so dass weitere zufällige Mutationen innerhalb des HSV-1 Genoms ausgeschlossen werden können (Abb. 4.13). Im Fall der HSV-1 SV40 NLS-UL31 NLSmt kann damit auch sichergestellt werden, dass die Sequenzduplikation keine negativen Effekte hervorgerufen hat. Die Mutagenese der UL31 NLS führte also zu HSV-1 BAC Mutanten, mit welchen durch Transfektion in Vero Zellen kein rekombinanter Virusstock hergestellt werden konnte. Alle Versuche einer *in trans* Komplementation mit Hilfe von UL31 wt-komplementierenden Vero sowie RSC (*rabbit skin cells*) Zellen war leider erfolglos. Daher basieren alle folgenden Experimente auf Transfektion von BAC DNA.

Da die eingeführten UL31 NLS Mutationen nahe dem 3' Ende des essentiellen UL32 Genproduktes liegen und im Fall der HSV-1 SV40 NLS-UL31 NLSmt gleich mehrere Veränderungen unmittelbar nach dessen Stopcodon vollzogen wurden, ist nicht auszuschließen, dass die UL31 NLS BAC Mutagenese Auswirkungen auf die Expression von UL32 hatte. Um dies zu überprüfen, wurde die Expression und subzelluläre Lokalisation von UL32 bei den verschiedenen UL31 Mutanten im Vergleich zum UL31 Wildtyp analysiert, nachdem Vero Zellen 20 h mit der entsprechenden BAC DNA transfiziert wurden. Die indirekte Immunofluoreszenz wurde mit Hilfe eines UL32 und ICP8 spezifischen Antikörpers, mit welchem die viralen Replikationszentren im Zellkern detektiert werden, durchgeführt. Aus früheren Studien konnte gezeigt werden, dass HSV-1 UL32 als ein essentielles DNA *cleavage/packaging* Protein während der Capsidreifung im Zellkern fungiert und neben einer nukleären Lokalisation, wo es speziell in den viralen Replikationszentren vorliegt, auch eine cytoplasmatische Verteilung aufweist (Lamberti und Weller, 1998). Diese beschriebene Lokalisation konnte in der UL31 wt Situation bestätigt werden. Auch die Assoziation mit den Replikationszentren wurde durch die Colokalisierung mit ICP8 demonstriert (Abb. 4.14). Für die UL31 NLSmt konnte somit gezeigt werden, dass weder die UL32 Expression noch die subzelluläre Verteilung von UL32 durch die UL31 BAC Mutageneseschritte beeinträchtigt

war. Letztere wies eine zum Wildtyp vergleichbare nukleo- und cytoplasmatische Lokalisation von UL32 sowie eine Colokalisation mit ICP8 auf. Sogar bei der UL31 Deletionsmutante konnte noch nukleäres und cytoplasmatisches UL32 detektiert werden. Bei der SV40 NLS-UL31 NLSmt zeigte sich, dass UL32 jedoch in geringeren Mengen exprimiert wurde und ungleichmäßiger im Zellkern verteilt war. Ebenso scheint diese Mutante weniger Replikationszentren zu entwickeln, welche wiederum eine atypische Lokalisation aufwiesen. Prinzipiell waren aber alle HSV-1 UL31 Mutanten in der Lage, Replikationszentren auszubilden (Abb. 4.14). Dies deutet darauf hin, dass zumindest die Virusreplikation im Zellkern unter diesen Bedingungen noch ablaufen kann.

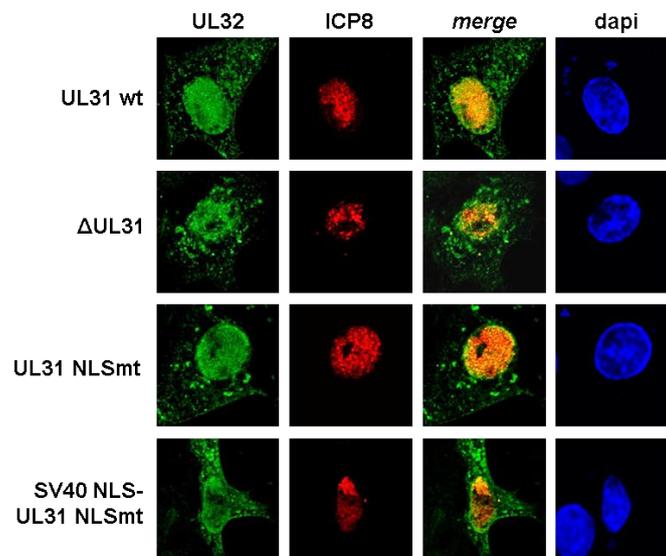


Abbildung 4.14: HSV-1 UL32 Expression und Lokalisation wird nicht durch die UL31 NLS Mutagenese beeinflusst

Für die verschiedenen UL31 Mutanten wurde die Expression und subzelluläre Lokalisation von HSV-1 UL32 im Vergleich zum UL31wt überprüft. Dazu wurden Vero Zellen mit BAC DNA transfiziert und 20 h.p.t. mittels indirekter Immunofluoreszenz unter Verwendung eines polyklonalen anti-UL32 (grün) und monoklonalen anti-ICP8 (rot) Antikörpers analysiert. Die Zellkerne wurden durch Dapi-Färbung (blau) visualisiert.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die UL31 NLS im viralen Kontext eine essentielle Funktion ausübt, da allein die Mutationen innerhalb dieses Sequenzbereiches für den letalen Phänotyp der HSV-1 UL31 NLSmt verantwortlich sind.

4.2.2.4. Die UL31 NLS ist spät in der Infektion für den Kernimport der NEC-Proteine redundant

Eine Ursache für den letalen Phänotyp der HSV-1 UL31 Mutanten könnte darin liegen, dass durch die mutierte NLS der Kernimport von UL31 beeinträchtigt ist, wie es ja bereits in den Transfektionsexperimenten in Abwesenheit einer Virusinfektion gezeigt werden konnte. Ob nun die HSV-1 UL31 NLS Mutagenese eine Auswirkung auf die subzelluläre Verteilung von UL31 und auch UL34 hat, wurde durch indirekte Immunofluoreszenz nach 20 h BAC DNA Transfektion in Vero Zellen analysiert. Dazu wurde neben den UL31 bzw. UL34 spezifischen

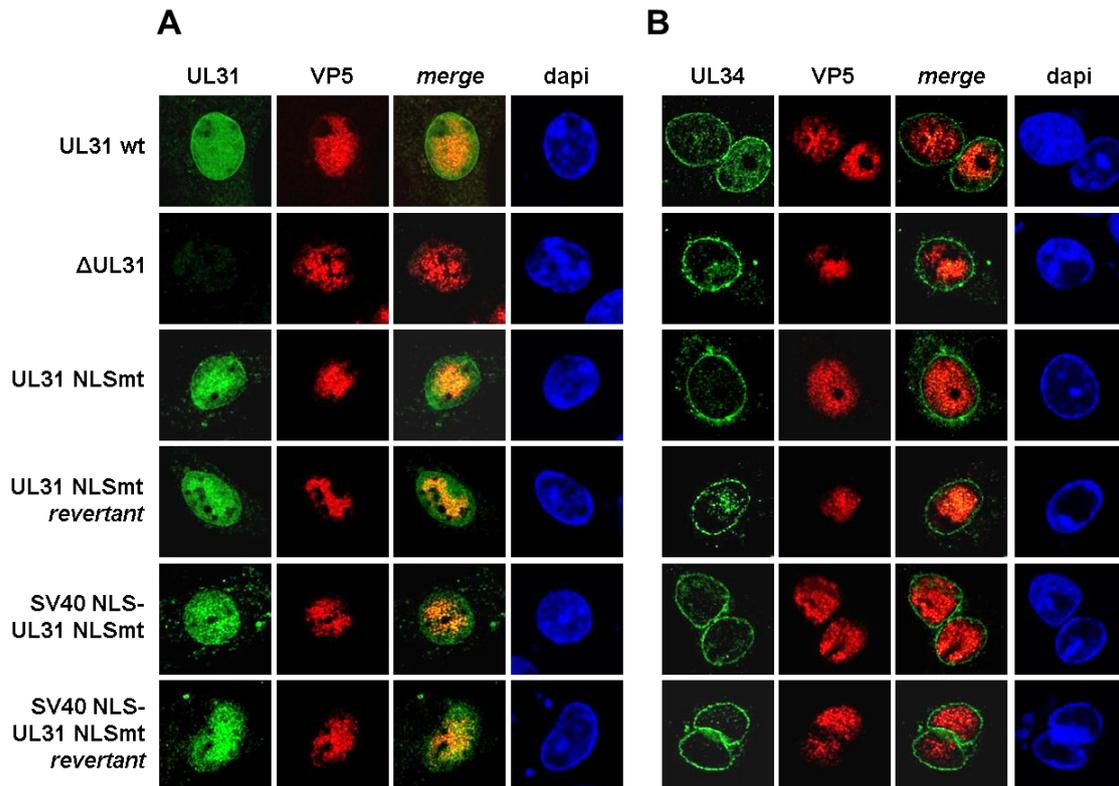


Abbildung 4.15: Die UL31 NLS Mutationen haben keine Auswirkung auf die Kernlokalisierung der HSV-1 NEC-Proteine

A) Die Expression und subzelluläre Lokalisation von UL31wt, UL31 Deletionsmutante sowie UL31 Mutanten (UL31 NLSmt und SV40 NLS-UL31 NLSmt einschließlich der entsprechenden Revertanten) wurde durch indirekte Immunofluoreszenz 20 h nach BAC DNA Transfektion in Vero Zellen mit einem polyklonalen anti-UL31 (grün) und monoklonalen anti-VP5 [8F5] (rot) Antikörper analysiert. Die Zellkerne wurden dabei durch Dapi-Färbung (blau) visualisiert. **B)** Die Lokalisation des NEC-Partners UL34 wurde mit einem polyklonalen anti-UL34 Antikörper analog detektiert.

Antikörpern auch ein VP5 spezifischer Antikörper verwendet, welcher ausschließlich Hauptcapsidproteine in reifen Capsiden detektiert (Abb. 4.15). Nach BAC Transfektion mit HSV-1 Wildtyp lag UL31 wie zu erwarten hauptsächlich nukleär sowie an der Kernperipherie vor. Bei der UL31 Deletionsmutante konnte verständlicherweise kein UL31 Protein detektiert werden. Überraschend war jedoch, dass auch die UL31 NLS Mutante eine wt-ähnliche Lokalisation von UL31 im Kern sowie an der Kernhülle aufwies. Entsprechendes gilt auch für die Revertante dieses UL31 NLSmt BAC. Ebenso konnte bei der SV40 NLS-UL31 NLSmt und dessen Revertante eine überwiegend nukleäre Verteilung von UL31 beobachtet werden. Es scheint also, dass der Kernimport von UL31 durch die NLS Mutagenese nicht beeinträchtigt worden ist. Ebenso befanden sich bei allen getesteten HSV-1 UL31 BAC Mutanten reife Capside vergleichbar zum UL31 wt im Zellkern, welche mit UL31 größtenteils colokalisierten (Abb. 4.15 A). Dies deutet darauf hin, dass neben der bereits gezeigten viralen Replikation vermutlich auch die Capsidmorphogenese ungestört abläuft und dass nukleäres UL31 zum Teil mit Nukleocapsiden assoziiert. Letzteres stimmt gut mit der vor kurzem für zwei UL31 orthologe Proteine berichteten Rolle beim *DNA packaging* Prozess

während der Capsidreifung überein (Granato *et al.*, 2008; Popa *et al.*, 2010). Über die subzelluläre Verteilung des NEC-Partners UL34 konnte bei allen UL31 Mutanten eine korrekte Lokalisation hauptsächlich an der Kernperipherie vergleichbar zum Wildtyp berichtet werden (Abb. 4.15 B). Die NLS von UL31 wird demnach im viralen Kontext für das UL34 *targeting* zur Kernhülle nicht benötigt, so dass die beobachtete essentielle Funktion der UL31 NLS unabhängig vom NEC sein muss.

Die Ergebnisse dieser Immunofluoreszenz Analyse konnten zeigen, dass die UL31 NLS Mutagenese in Anwesenheit von anderen viralen Proteinen keine störende Auswirkung auf die nukleäre Lokalisation beider NEC-Proteine hatte. Folglich scheint es, dass das HSV-1 System einen redundanten Mechanismus für den Kernimport von UL31 bereitstellt. Der letale Phänotyp einer UL31 NLS Mutante weist jedoch darauf hin, dass UL31 eine weitere essentielle Funktion hat, die möglicherweise zu einem anderen, früheren Zeitpunkt der Infektion relevant ist.

4.2.3. Simultane Analyse der UL31 und UL34 NLS im viralen Kontext

Wie bereits gezeigt werden konnte, beeinträchtigte weder die UL34 noch die UL31 NLS Mutagenese den Kernimport dieser beiden Proteine im viralen Kontext. Möglicherweise kann der funktionale Verlust eines Kernlokalisierungssignals durch das noch vorhandene im Partnerprotein kompensiert werden. Um eine mögliche Abhängigkeit aufgrund eines gemeinsamen Transports untersuchen zu können, wurde eine HSV-1 Doppelmutante generiert, welche beide NLS Mutationen enthält, d.h. sowohl im UL31 als auch im UL34 Genprodukt. Dazu wurde der im Abschnitt 4.2.1.1 beschriebene BAC HSV-1(17⁺)lox UL34 NLSmt, der bereits die mutierte UL34 NLS trägt, für eine *galk*-kan BAC Mutagenese am UL31 Locus verwendet. Diese verlief analog zu der beim HSV-1(17⁺)lox UL31 NLSmt angewendeten ab (siehe Abschnitt 4.2.2.2).

4.2.3.1. Die simultane NLS Mutagenese beider NEC-Proteine beeinträchtigt deren Kernimport

Das durch die doppelte NLS Mutagenese entstandene BAC HSV-1(17⁺)lox UL31 NLSmt-UL34 NLSmt war nicht lebensfähig, d.h. es fand keine erfolgreiche Virus-Rekonstitution statt, weswegen auch keine *Plaquebildung* beobachtet werden konnte (Abb. 4.16 A). Dies war jedoch zu erwarten, da bereits die UL31 NLS Mutagenese allein zu einer letalen Mutante führte. Ebenso konnte eine wt-ähnliche subzelluläre Verteilung von UL32 mittels indirekter Immunofluoreszenz nach 20 h BAC DNA Transfektion in Vero Zellen bestätigt werden, so dass auch hier eine Störung des UL32 Genproduktes aufgrund der UL31 NLS BAC Mutagenese ausgeschlossen werden kann (Abb. 4.16 B). Im Gegensatz dazu konnte jedoch unter diesen Bedingungen eine veränderte Lokalisierung der NEC-Proteine beobachtet werden. Neben nukleärem UL31 befand sich ein erheblicher Anteil diffus verteilt im

Cytoplasma (Abb. 4.16 C). Auch das UL34 Protein wies eine deutliche Mislokalisierung auf, da es sowohl nukleo- als auch cytoplasmatisch vorlag, wobei es im Cytoplasma in ungleichmäßigen punktierten Foci gefunden wurde (Abb. 4.16 D). In beiden Fällen konnte kaum noch Kernmembran-assoziiertes Protein erkannt werden. Dies bedeutet, dass in dieser NLS Doppelmutante auch die Bildung eines funktionalen Kernauswanderungskomplexes an der INM gestört war. Ferner konnte durch die Detektion von ICP8 und VP5 gezeigt werden, dass weder die Virusreplikation noch die Capsidmorphogenese im Zellkern wesentlich beeinträchtigt wurde.

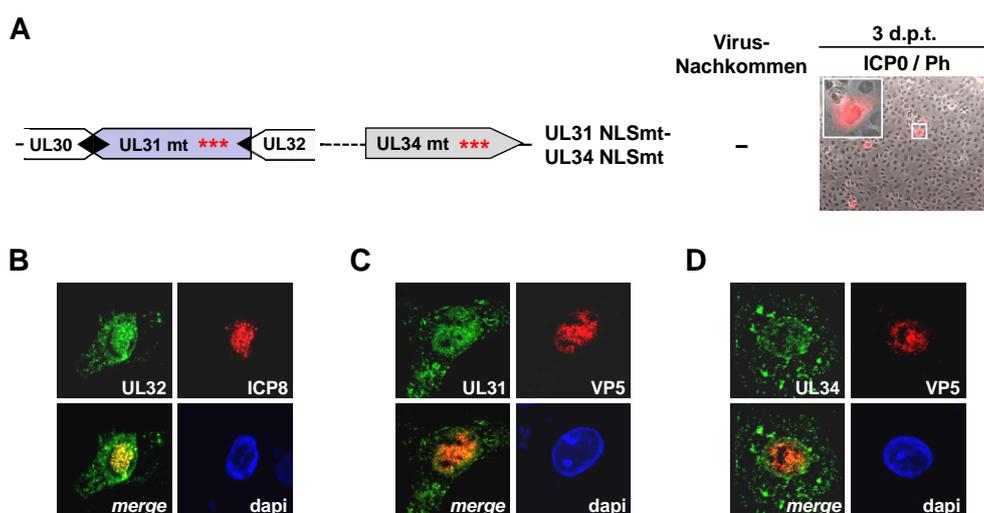


Abbildung 4.16: Analyse der NLS Doppelmutante HSV-1 UL31 NLSmt-UL34 NLSmt

A) Schematische Darstellung des hergestellten BAC HSV-1 UL31 NLSmt-UL34 NLSmt, welcher Mutationen innerhalb der NLS Sequenz beider NEC-Proteine trägt. Für die Produktion von Virus-Nachkommen wurden Vero Zellen mit BAC DNA transfiziert. Die *Plaquetbildung* wurde nach 3 Tagen Transfektion durch indirekte Immunofluoreszenz mit einem monoklonalen anti-ICP0 Antikörper analysiert. ICP0-positive Zellen sind rot dargestellt und mit dem Phasenkontrast (Ph) überlagert. **B)** Die Expression und subzelluläre Lokalisation von UL32 wurde nach 20 h BAC DNA Transfektion mittels indirekter Immunofluoreszenz unter Verwendung eines polyklonalen anti-UL32 (grün) und monoklonalen anti-ICP8 (rot) Antikörpers analysiert. Die Zellkerne wurden dabei durch Dapi-Färbung (blau) visualisiert. **C)** Die Lokalisation von UL31 wurde mit einem polyklonalen anti-UL31 (grün) und monoklonalen anti-VP5 [8F5] (rot) Antikörper analog durchgeführt. **D)** Die Lokalisation des NEC-Partners UL34 wurde durch einen polyklonalen anti-UL34 Antikörper analog detektiert.

Während also die einzelne NLS Mutagenese entweder von UL31 oder UL34 keine Auswirkungen auf deren Kernimport im viralen Kontext hat, weisen die Ergebnisse der Doppelmutante darauf hin, dass die simultane NLS Mutagenese den Transport der NEC-Proteine in den Zellkern erheblich beeinträchtigt. Es ist jedoch unklar, wie sich die verminderte Kernimportaktivität von UL31 und UL34 auf den herpesviralen Replikationsverlauf auswirkt, da bereits durch die ins Genom eingeführte UL31 NLS Mutation eine letale Mutante entstand. Somit ist es schwierig auf Ebene der BAC DNA Transfektion zu unterscheiden, ob der letale Phänotyp durch eine noch unbekannte essentielle Funktion der UL31 NLS Sequenz verursacht wird oder zusätzlich durch einen nicht ausreichend funktionalen Transport der NEC-Proteine erklärt werden kann.

4.3. Virus-Wirt-Interaktionen der HSV-1 NEC-Proteine

Am *nuclear egress* der HSV-1 Capside sind außer den beiden NEC-Proteinen UL31 und UL34 vermutlich auch mehrere zelluläre Faktoren beteiligt. Jedoch konnten bis jetzt erst wenige davon identifiziert werden, wie z.B. die zelluläre Proteinkinase C, welche durch die NEC-Proteine zum Knospungsort an der INM rekrutiert wird (Reynolds *et al.*, 2004; Simpson-Holley *et al.*, 2005; Park und Baines, 2006; Mou *et al.*, 2008). Generell erfordert ein reibungsloser Replikationsverlauf, dass zelluläre Prozesse ausgeschaltet oder zugunsten des Virus moduliert werden, wofür zusätzlich zu den intraviralen Protein-Protein-Interaktionen auch Wechselwirkungen mit Wirtsproteinen dringend vonnöten sind.

Im Hinblick auf diese Arbeit sind mögliche Virus-Wirt-Interaktionen der HSV-1 NEC-Proteine von besonderem Interesse. Beim TA-Insertionsfaktor Asna1 und bei der Phospholipid Scramblase 1 (PLSCR1) handelt es sich um zwei vielversprechende Wirtsfaktoren, welche u.a. mit HSV-1 UL31 und vor allem mit dem *tail anchor* Protein UL34 in Verbindung gebracht werden können. Die Rolle dieser ausgewählten zellulären Proteine während der HSV-1 Infektion sollte nun im Folgenden näher analysiert werden, um erste mechanistische Einblicke zu gewinnen.

4.3.1. Bedeutung des TA-Insertionsfaktors Asna1 für die HSV-1 Replikation

Ein allgemeines charakteristisches Merkmal von TA-Proteinen ist ihr post-translationaler Membran-Insertionsmechanismus, wodurch sie sich von anderen Transmembranproteinen unterscheiden. Mehrere Studien über zelluläre TA-Proteine weisen darauf hin, dass dabei die kürzlich entdeckte cytosolische ATPase Asna1 eine wichtige Rolle spielt. Diese bindet als Chaperon spezifisch an die TMD von neu synthetisierten TA-Proteinen und sorgt zusammen mit weiteren Komponenten des sogenannten *transmembrane domain recognition complex* (TRC) für die korrekte Zielsteuerung von TA-Proteinen sowie die anschließende Insertion in die ER-Membran (Stefanovic und Hegde, 2007; Rabu *et al.*, 2009; Borgese und Fasana, 2011). Im Hefesystem konnte mit der Deletion des Asna1 homologen Proteins Get3 bereits für mehrere TA-Proteine ein Verlust der Insertionsfähigkeit bzw. eine Mislokalisierung gezeigt werden (Schuldiner *et al.*, 2008).

Das HSV-1 Genom kodiert für insgesamt 18-19 Transmembranproteine, wobei drei davon Mitglieder der TA-Proteinfamilie sind. Neben dem bereits ausführlich bearbeiteten UL34 handelt es sich auch bei den Typ II-Transmembranproteinen UL56 und US9 um TA-Proteine. Im Gegensatz zu dem innerhalb der *Herpesviridae* konservierten UL34, welches eine wichtige Rolle bei der Auswanderung der Nukleocapside vom Zellkern spielt, sind diese beiden HSV-1 Proteine jedoch in Zellkultur nicht essentiell und kommen nur innerhalb der α -Herpesviren vor. Auch ihre Funktion ist noch weitgehend unbekannt. Mehrere Studien vor

allem mit HSV-2 und PrV zeigten, dass sowohl UL56 als auch US9 hauptsächlich am TGN lokalisieren und vermutlich an vesikulären Transportprozessen beteiligt sind (Koshizuka *et al.*, 2002; Snyder *et al.*, 2008; Lyman *et al.*, 2009). Somit wäre es denkbar, dass UL56 und US9 womöglich die sekundäre Umhüllung der Viruspartikel an modifizierten TGN-Membranen beeinflussen.

Im Folgenden soll nun die Rolle des Insertionsfaktors Asna1 für die Zielsteuerung und die Membraninsertion des HSV-1 NEC-Proteins UL34 sowie für die zwei weiteren viralen TA-Proteine UL56 und US9 basierend auf spezifischen RNA Interferenz Experimenten untersucht werden, wie auch die funktionale Auswirkung von Asna1 auf den herpesviralen Replikationsverlauf im generellen.

4.3.1.1. Asna1 interagiert spezifisch mit den HSV-1 kodierten TA-Proteinen

Die drei HSV-1 kodierten *tail anchor* Proteine UL34, UL56 und US9 zeichnen sich alle durch eine einzelne hydrophobe TMD am C-terminalen Ende aus, welche jeweils mit Hilfe des Programms Tmpred (www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) bestimmt bzw. bestätigt wurde (Abb. 4.17 A). Für zelluläre TA-Proteine wurde bereits berichtet, dass die TA-Region die Bindestelle für den potentiellen cytosolischen TA-Insertionsfaktor Asna1 darstellt (Stefanovic und Hegde, 2007). Um nun eine mögliche Interaktion von Asna1 mit den HSV-1 TA-Proteinen UL34, UL56 und US9 mittels Y2H-Methode zu testen, wurden die entsprechenden kodierenden Sequenzen mit Hilfe des Gateway®-Systems in Y2H *bait* Vektoren kloniert, während Asna1 aus der humanen Genbank MGC (*Mammalian Gene Collection*) (Lamesch *et al.*, 2007) in einen Y2H *prey* Vektor umgesetzt wurde. Zusätzlich wurde als Negativkontrolle auch das HSV-1 Typ II-Transmembranprotein UL45 mitgeführt. In UL45 liegt die TMD innerhalb der N-terminalen Domäne, wodurch es co-translational in Membranen inseriert werden kann. Die Y2H-Ergebnisse zeigten, dass alle drei TA-Proteine mit dem Insertionsfaktor Asna1 interagierten, da alle diploiden Hefezellen, welche Asna1 zusammen mit UL34, UL56 oder US9 exprimierten, auf Selektivmedium wachsen konnten. Im Gegensatz dazu konnte keine Bindung von UL45 an Asna1 beobachtet werden (Abb. 4.17 B). Dies deutet auf eine für TA-Proteine spezifische Interaktion mit Asna1 hin, weswegen es gut denkbar wäre, dass auch die HSV-1 TA-Proteine den Asna1-vermittelten *Pathway* für ihre Biogenese nutzen. Dadurch könnte Asna1 eine wichtige Rolle bei der HSV-1 Replikation übernehmen. In HSV-1 infizierten Zellen konnte das Protein sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern detektiert werden (Abb. 4.17 C). Diese beobachtete Verteilung von endogenem Asna1 stimmt mit früheren Befunden überein, demzufolge führte die Infektion mit HSV-1 zu keiner subzellulären Umverteilung des Proteins (Kurdi-Haidar *et al.*, 1998).

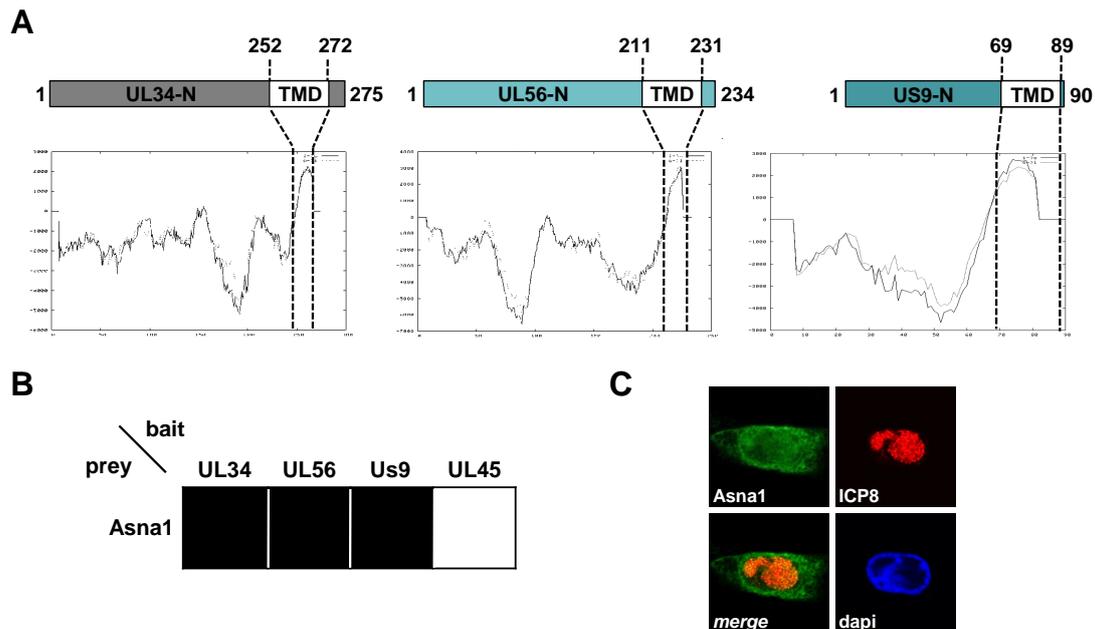


Abbildung 4.17: Die tail anchor Proteine von HSV-1 interagieren mit dem TA-Insertionsfaktor Asna1

A) Die schematische Darstellung der HSV-1 TA-Proteine UL34, UL56 und US9 zeigt jeweils deren C-terminale hydrophobe TMD, welche mittels TMPred vorhergesagt wurde. **B)** Die Interaktion der HSV-1 TA-Proteine UL34, UL56 und US9 mit dem TA-Insertionsfaktor Asna1 wurde mittels Y2H-Methode getestet. Als Negativkontrolle diente UL45, ein HSV-1 Typ II-Transmembranprotein (schwarz = positive Interaktion, weiß = keine Interaktion). **C)** Um die subzelluläre Verteilung von Asna1 während der HSV-1 Infektion zu analysieren, wurden Hela Zellen 12 h mit HSV-1(F) infiziert (MOI 1) und anschließend eine indirekte Immunfluoreszenz mit Hilfe eines Asna1- und ICP8-spezifischen Antikörpers, welcher als Infektionsmarker eingesetzt wurde, durchgeführt.

4.3.1.2. Silencing der Asna1 Expression mittels RNA Interferenz

Um mehr über die mögliche Funktion von Asna1 bei der HSV-1 Replikation zu erfahren, wurden mit Hilfe der RNA Interferenz funktionale Assays durchgeführt. Nach einer erfolgreichen Suppression der Asna1 Expression durch eine für dessen Transkript spezifische siRNA kann anschließend der Einfluss von Asna1 auf verschiedenste Prozesse analysiert werden. Dazu wurden Hela Zellen mit einem Asna1-spezifischen siRNA Pool transfiziert und nach 48 h Zelllysate hergestellt, um den Silencing Erfolg mittels SDS-PAGE und Immunoblot durch die Detektion von Asna1 (38 kDa) unter Verwendung eines Asna1-spezifischen Antikörpers überprüfen zu können. Als Kontrolle dienten dabei jeweils Zellen, die mit einer Kontroll- (ctrl-) siRNA, welche keine homologe Zielsequenz im menschlichen Genom besitzt und daher auch keine Auswirkungen auf die Zelle haben sollte, analog behandelt wurden. Das Ergebnis des Immunoblots zeigt, dass 48 h nach Transfektion von spezifischer siRNA die Expression von Asna1 im Vergleich zur ctrl-siRNA nahezu komplett unterdrückt wurde, während die Menge an Lamin B (67 kDa), welches als Ladekontrolle verwendet wurde, unter beiden Bedingungen gleich blieb (Abb. 4.18).

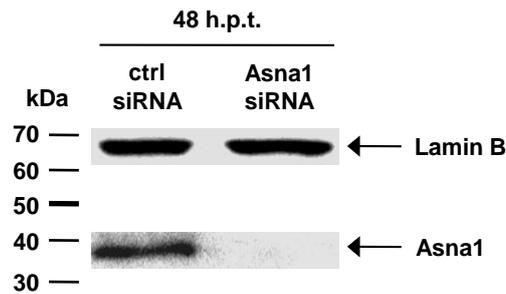


Abbildung 4.18: Analyse des *Silencing* Erfolges von Asna1 mittels Immunoblot

48h nach Transfektion wurden Zelllysate von Asna1- bzw. Kontroll- (ctrl-) siRNA behandelten Hela Zellen hergestellt und im SDS-Gel (10%) aufgetrennt. Anschließend wurde mittels Immunoblot die Detektion von Asna1 (38 kDa) unter Verwendung eines monoklonalen anti-Asna1 Antikörpers und eines entsprechenden Peroxidase-gekoppelten Sekundäntikörpers durchgeführt. Als Ladekontrolle wurde die Menge an Lamin B (67 kDa) analog mit einem polyklonalen anti-Lamin B Antikörper bestimmt.

Mit dem verwendeten siRNA-System kann folglich ein effizientes und homogenes *Silencing* der Asna1 Expression erreicht werden, ohne dabei die Hela Zellen in ihrer Lebensfähigkeit zu beeinträchtigen, wodurch weitere auf siRNA basierende Experimente zur funktionalen Analyse von Asna1 ermöglicht werden. Dabei wurde jedesmal der *Silencing* Erfolg wie eben beschrieben kontrolliert, wobei der hier gezeigte Immunoblot exemplarisch für alle gilt.

4.3.1.3. Asna1 hat keinen Einfluss auf die Zielsteuerung sowie Membraninsertion der HSV-1 TA-Proteine

Die vorangegangenen Y2H-Interaktionsstudien zeigten, dass Asna1 spezifisch mit den HSV1 TA-Proteinen UL34, UL56 und US9 interagiert. Ob nun der Asna1-vermittelte *Pathway* tatsächlich für die Zielsteuerung und die anschließende Membraninsertion der HSV-1 TA-Proteine verantwortlich ist, sollte durch Analyse ihrer subzellulären Lokalisation in Asna1-depletierten Zellen bestimmt werden. Dafür wurden Hela Zellen zuerst 48 h mit Asna1- bzw. ctrl-siRNA behandelt. In diesen wurde anschließend entweder UL34, UL56 oder US9 transient exprimiert. Nach 20 h wurde die subzelluläre Verteilung jedes einzelnen mittels indirekter Immunofluoreszenz bestimmt. Dabei wies das allein exprimierte HSV-1 Protein UL34 eine normale Lokalisation im Cytoplasma sowie an der Kernperipherie auf, vergleichbar mit den Kontroll-Zellen. Auch die Colokalisation mit Calreticulin, einem luminalen ER-Protein, konnte unter beiden Bedingungen gezeigt werden (Abb. 4.19 links). Die in der Literatur beschriebene subzelluläre Lokalisation von HSV-1 UL56 am TGN wurde in den ctrl-siRNA behandelten Zellen durch die Colokalisation mit Giantin, einem zellulären Protein des Golgi-Komplexes, bestätigt. Auch in den Asna1 depletierten Zellen konnte eine vergleichbare TGN-Lokalisierung von UL56 gezeigt werden (Abb. 4.19 Mitte). Bei der Verteilung von HSV-1 US9 konnte ebenfalls kein Unterschied beobachtet werden. Unter beiden Bedingungen konnte dieses Protein ähnlich wie Giantin hauptsächlich am Golgi-Komplex gefunden werden (Abb. 4.19 rechts).

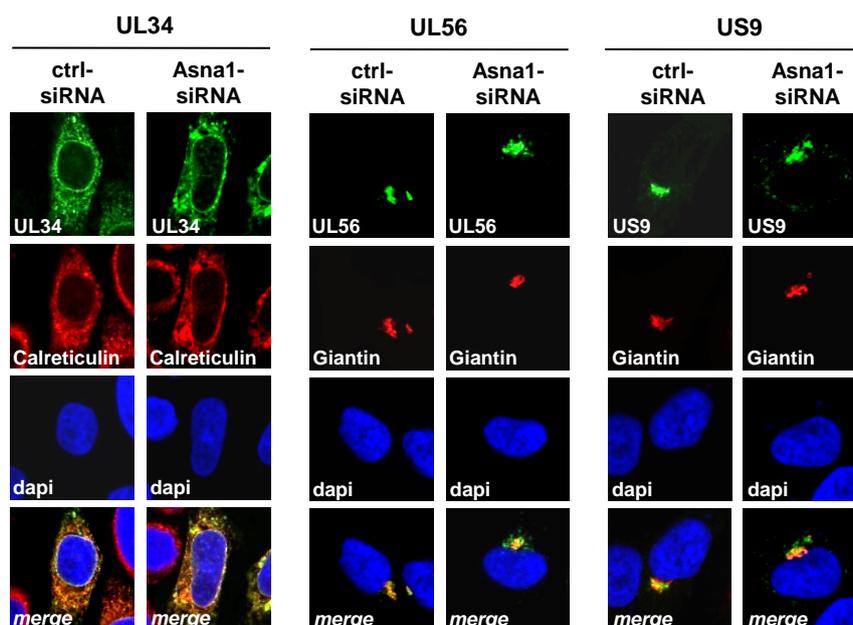


Abbildung 4.19: Die Zielsteuerung und Membraninsertion der HSV-1 TA-Proteine erfolgt unabhängig von Asna1

Hela Zellen wurden mit Kontroll- (ctrl-) bzw. Asna1-siRNA behandelt und nach 48 h mit Plasmiden, die *myc-getaggt*es UL34, UL56 oder US9 kodieren, transfiziert. Nach 20 h wurde die subzelluläre Lokalisation der drei HSV-1 TA-Proteine durch indirekte Immunfluoreszenz Analyse mit Hilfe eines monoklonalen anti-*myc* Antikörpers (grün) in Kombination mit entweder einem polyklonalen anti-Calreticulin oder einem polyklonalen anti-Giantin Antikörper (beide rot) bestimmt. Die Zellkerne wurden mittels Dapi-Färbung (blau) visualisiert.

Zusammenfassend konnte mit den Ergebnissen dieser Immunfluoreszenz Analyse gezeigt werden, dass die Depletion von Asna1 keine Auswirkung auf die subzelluläre Lokalisation der HSV-1 *tail anchor* Proteine hatte. Dies deutet somit darauf hin, dass Asna1 bzw. der Asna1-vermittelte *Pathway* vermutlich weder für ihre Membraninsertion noch für deren korrekte Zielsteuerung zu spezifischen Membranen benötigt wird.

4.3.1.4. Asna1 ist für die effiziente Auswanderung der neu gebildeten HSV-1 Virionen wichtig

Die bisherigen Versuche weisen darauf hin, dass Asna1 keine wesentliche Rolle bei der Biogenese der HSV-1 TA-Proteine UL34, UL56 und US9 spielt. Ob dieses zelluläre Protein überhaupt einen Einfluss auf die herpesvirale Replikation ausübt, sollte durch die Bestimmung der Wachstumskinetik in siRNA behandelten Zellen untersucht werden. Dafür wurden Hela Zellen mit Kontroll- bzw. Asna1-siRNA behandelt und 48h später mit HSV-1 (F) mit einer MOI von 0,1 infiziert. Anschließend wurde zu verschiedenen Zeitpunkten zum einen der Kulturüberstand abgenommen und damit die Anzahl der von den Zellen ins extrazelluläre Milieu abgegebenen infektiösen Viruspartikel mittels *Plaque Assay* bestimmt. Zusätzlich sollte auch die Frage beantwortet werden, ob die Abwesenheit von Asna1 einen Effekt auf die Bildung von infektiösen Virionen haben könnte. Daher wurde zu jedem Zeitpunkt auch das Zellpellet entnommen und nach erfolgtem Zellaufschluss die Menge an reifen

intrazellulären Viren durch *Plaque Assay* quantifiziert. Diese separate Analyse ermöglicht eine Unterscheidung der insgesamt gebildeten, jedoch noch Zell-assoziierten infektiösen Virionen von den bereits ins extrazelluläre Milieu freigesetzten Virionen.

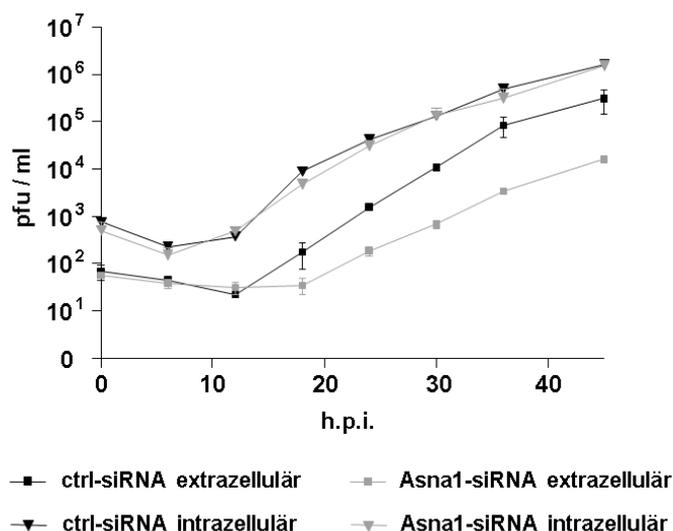


Abbildung 4.20: Asna1 beeinflusst die Auswanderung neu gebildeter HSV-1 Virionen

Um den Effekt von Asna1 auf die Auswanderung der HSV-1 Virionen zu analysieren, wurden HeLa Zellen 48h mit Kontroll- (ctrl-) bzw. Asna1-siRNA behandelt und anschließend mit HSV-1(F) (MOI 0,1) in Triplikaten infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion (h.p.i.) wurden mittels *Plaque Assay* die Virustiter (pfu/ml) sowohl von den freigesetzten Virionen aus dem Kulturüberstand als auch von den Zell-assoziierten nach Aufschluss des Zellpellets bestimmt. Die Kinetik der Virusfreisetzung (extrazellulär) ist als Viereck und die der Virusbildung (intrazellulär) als Dreieck dargestellt.

Die Zeitverläufe der extrazellulären Proben zeigen, dass bei Asna1-depletierten Zellen die Freisetzung von infektiösen Virionen ins extrazelluläre Milieu später und vor allem in geringerer Menge erfolgte als bei Kontroll-siRNA behandelten Zellen. Im Kontrollansatz konnte ein Anstieg von extrazellulären Viruspartikeln schon nach etwa 12 h beobachtet werden, während in Asna1-depletierten Zellen die exponentielle Phase der Virusfreisetzung verzögert erst nach etwa 18 h einsetzte. Ab diesem Zeitpunkt wurden im Vergleich zur Kontrolle auch mindestens zehnmal weniger infektiöse Viruspartikel ins Kulturmedium abgegeben. Im Gegensatz dazu war während des gesamten Zeitverlaufs die Menge an infektiösen intrazellulären Virionen unter beiden Bedingungen äquivalent (Abb. 4.20).

Mit diesem Versuch konnte also gezeigt werden, dass durch die Abwesenheit des Asna1 Proteins die Virusreplikation von HSV-1 deutlich beeinträchtigt wurde. Mit der gleichzeitigen Quantifizierung der Zell-assoziierten infektiösen Virionen konnte jedoch eine Rolle von Asna1 bei der Virusbildung ausgeschlossen werden. Diese Daten deuten somit darauf hin, dass Asna1 zwar nicht für die Bildung von infektiösen Virionen benötigt wird, jedoch an der anschließenden Auswanderung aus der Zelle beteiligt sein könnte. Im Folgenden sollte nun die Rolle von Asna1 durch eine detaillierte Analyse einzelner Schritte des herpesviralen Replikationszyklus nochmals bestätigt bzw. genauer definiert werden.

Um einen möglichen Einfluss von Asna1 bereits während des Eintritts der HSV-1 Virionen in die Wirtszelle auszuschließen, wurden Hela Zellen 48 h nach siRNA Behandlung mit HSV-1(F) mit einer MOI von 0,5 infiziert und nach 4 h mittels indirekter Immunfluoreszenz die Anzahl von infizierten Zellen durch die Detektion des *immediate early* Proteins ICP0 von HSV-1 bestimmt. Bei den markierten Zellen handelt es sich dabei ausschließlich um primär infizierte Zellen, da eine Reinfektion in dem gewählten Zeitrahmen nicht möglich gewesen wäre. Die statistische Auswertung von jeweils 700 Zellen zeigte kaum einen Unterschied zwischen den beiden Ansätzen, da 20% der Kontrollzellen und vergleichbare 19% der Asna1 depletierten Zellen primär infiziert waren (Abb. 4.21 A), während das *Silencing* des HSV-1 *Entry* Rezeptors PVRL1/Nectin 1 die Expression von ICP0 beinahe vollständig unterdrückte (Bailer und Haas, unpublizierte Daten). Somit kann eindeutig eine frühe Funktion von Asna1 beim Eintritt der Herpesviren in die Wirtszelle ausgeschlossen werden. Der quantitative Nachweis eines *immediate early* Proteins weist zusätzlich darauf hin, dass auch die frühe Genexpression durch das Fehlen des Asna1 Proteins nicht beeinträchtigt wurde. Anschließend wurde eine genauere Untersuchung der viralen Proteinexpression durchgeführt, indem siRNA behandelte Hela Zellen über einen Zeitraum von 10 h mit HSV-1(F) mit einer MOI von 1 infiziert und zu mehreren Zeitpunkten Zelllysate hergestellt wurden. Diese wurden in einem Immunoblot durch die Detektion von mehreren viralen Proteinen analysiert, wobei Markerproteine der drei Expressionsphasen der HSV-1 Replikation herangezogen wurden. Hierbei wurden die Proteine ICP0 und ICP27 als Vertreter der *immediate early* Proteine, Glykoprotein B (gB) als Beispiel eines *early* Proteins sowie UL34 und VP5 für die Gruppe der *late* exprimierten Proteine ausgewählt (Abb. 4.21 B). Wie zu erwarten, konnten die *immediate early* Proteine ICP0 und ICP27 bereits 2 h nach Infektion (2 h.p.i.) in sehr geringen Mengen und ab 4 h.p.i. bis zum Ende des untersuchten Zeitrahmens mit einem konstant starken Signal nachgewiesen werden. Das *early* Protein gB hingegen zeigte sich erst nach 6 h.p.i., ebenso das *late* Protein UL34, während das VP5 Protein erst ab 8 h nach Infektion auf dem Immunoblot erscheint. Jedoch konnte zwischen ctrl- und Asna1-siRNA behandelten Zellen kein signifikanter Unterschied in der detektierten Proteinmenge für die *immediate early*, *early* sowie *late* Proteine visualisiert werden. Die Auftragsmenge der einzelnen Proben konnte durch den Nachweis des zellulären Proteins β -Aktin kontrolliert werden. Demnach scheint Asna1 keinen Einfluss auf die herpesvirale Genexpression auszuüben.

Zuletzt wurde die virale DNA-Replikation nochmals detaillierter untersucht, indem 30 h nach HSV-1 Infektion von den extrazellulären Viruspartikeln, die aus dem Kulturüberstand gewonnen wurden, die Anzahl viraler Genomkopien mittels *realtime* quantitativer PCR sowie der tatsächliche Virustiter mittels *Plaque Assay* ermittelt wurde. Im Vergleich zu den Kontroll-siRNA behandelten Zellen führte der Verlust des Asna1 Proteins zu einer 4 - 5 fachen

Reduktion der quantifizierten HSV-1 Genomkopien, welche von der Zelle freigesetzt wurden. Analog entsprach auch der Virustiter d.h. die Infektiosität der extrazellulären Virionen, die in Asna1 depletierten Zellen gebildet wurden, nur noch etwa 25% des für die Kontrollzellen ermittelten Wertes (Abb. 4.21 C). Das daraus resultierende Verhältnis zwischen Genomkopien und *plaque forming unit* (pfu) (*particle to pfu ratio*) war jedoch wieder vergleichbar, so dass auch die Infektiosität der Viruspartikel um denselben Faktor verringert wurde (Abb. 4.21 D). Diese erhaltenen Daten stimmen auch gut mit den zuvor besprochenen Ergebnissen der Wachstumskinetiken überein, so dass man sagen kann, dass Asna1 zwar keinen Einfluss auf die Bildung sowie Infektiosität der Virionen hat, jedoch für deren Auswanderung aus den Zellen benötigt wird.

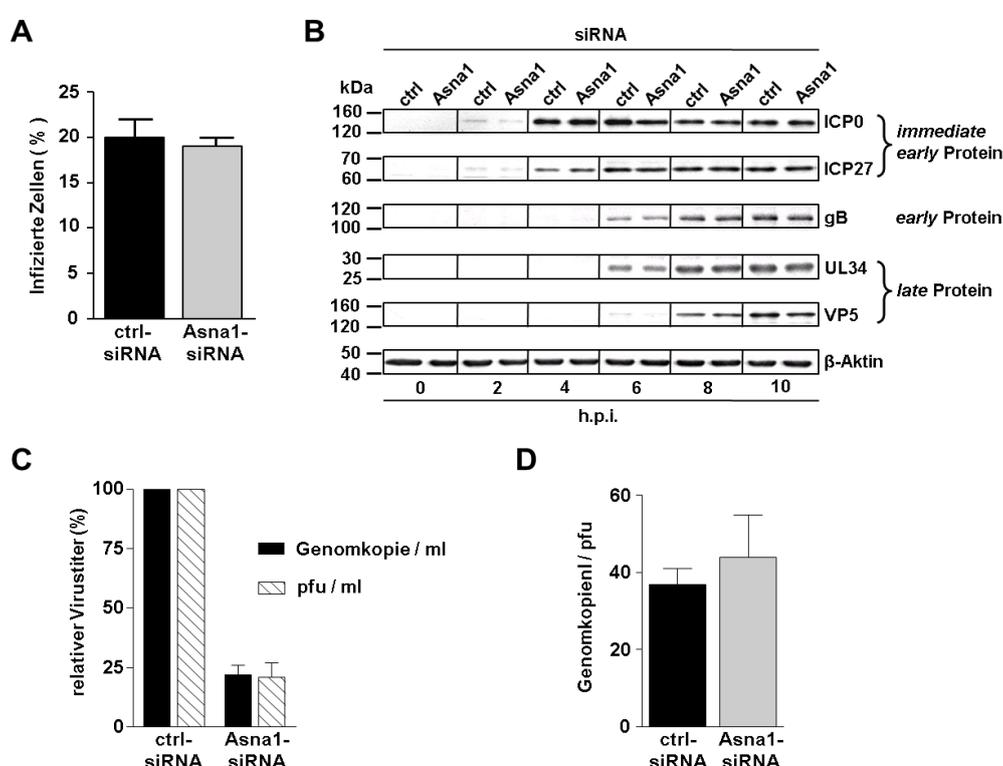


Abbildung 4.21: Asna1 spielt keine Rolle beim Eintritt sowie der nukleären Morphogenese der HSV-1 Virionen

A) Um den Einfluss von Asna1 auf den Eintritt der HSV-1 Virionen und auf die frühe Genexpression zu untersuchen, wurden Hela Zellen mit Kontroll- (ctrl-) bzw. Asna1-siRNA behandelt, nach 48 h mit HSV-1(F) (MOI 0,5) für 4 h infiziert und anschließend mittels indirekter Immunfluoreszenz unter Verwendung eines monoklonalen anti-ICP0 Antikörpers analysiert. Die Zellkerne wurden mittels Dapi-Färbung (blau) visualisiert. Insgesamt wurden jeweils 700 Zellen statistisch ausgewertet (ICP0 positiv = infizierte Zelle). **B)** Zur Untersuchung der viralen Proteinexpression wurden Asna1- bzw. ctrl-siRNA behandelte Hela Zellen nach 48 h mit HSV-1(F) (MOI 1) für 10 h infiziert, zu den angegebenen Zeitpunkten Zelllysate hergestellt und mittels Immunoblot mit Hilfe von ICP0, ICP27, Glycoprotein B (gB), UL34 und VP5 spezifischen Antikörpern analysiert. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von β -Aktin analog mit einem β -Aktin spezifischen Antikörper. **C)** Zur Analyse der viralen DNA-Replikation wurden Hela Zellen 48h mit ctrl- bzw. Asna1-siRNA behandelt und anschließend mit HSV-1(F) (MOI 0,1) infiziert. Der Kulturüberstand wurde 30 h nach Infektion abgenommen und von den freigesetzten Virionen die Anzahl viraler Genomkopien mittels *realtime* qPCR sowie der Virustiter (pfu/ml) mittels *Plaque Assay* in Triplikaten bestimmt und auf die ctrl-Werte normalisiert. **D)** Aus den in C) ermittelten Werten wurde das Genomkopien / pfu- Verhältnis bestimmt.

Zusammenfassend konnte mit Hilfe der RNA Interferenz gezeigt werden, dass Asna1 für die effiziente Freisetzung der Virionen aus der Zelle benötigt wird, jedoch keinen Einfluss auf den Virus-Eintritt, die herpesvirale Genexpression oder auf die Bildung und Infektiosität der Viruspartikel hat. Dies deutet auf eine Beteiligung des Proteins an den finalen Replikationsschritten hin.

4.3.2. Phospholipid Scramblase 1 – Implikationen für den herpesviralen Replikationsverlauf

Die Phospholipid Scramblase 1 (PLSCR1) ist ein Mitglied der konservierten Phospholipid Scramblase Proteinfamilie und an mehreren zellulären Prozessen beteiligt, wie z.B. bei der Kalzium-abhängigen Umverteilung von Phospholipiden, der Zellproliferation und Apoptose, der Genregulation, der Aktivierung der zellulären Immunantwort sowie der Signaltransduktion (Sahu *et al.*, 2007). Auch die Replikation von HSV-1 wird durch dieses multifunktionale Protein beeinflusst, wie bereits im Vorfeld durch eine systematische, genomweite Analyse basierend auf RNA Interferenz gezeigt werden konnte. Desweiteren wurde das PLSCR1 Protein in einem zusätzlichen genomweiten Y2H *screen*, in welchem 107 HSV-1 cDNA Konstrukte auf Interaktion gegen die humane Genbank MGC getestet wurden, als Interaktionspartner für die HSV-1 Proteine UL34, UL31 und UL43 identifiziert (J. Haas, unpublizierte Daten). Dieser Wirtsfaktor stellt somit hinsichtlich dieser Arbeit einen besonders interessanten zellulären Kandidaten dar, da aufgrund der Wechselwirkung mit den HSV-1 NEC-Proteinen eine Rolle während der Kernausswanderung der Capside möglich wäre.

Im Folgenden wurden die im Y2H *screen* gefundenen Interaktionen nochmals detailliert betrachtet und anschließend die Bedeutung des Wirtsproteins PLSCR1 für einzelne herpesvirale Replikationsschritte mit Hilfe von RNA Interferenz untersucht, um den Einfluss von PLSCR1 auf den Replikationszyklus von HSV-1 möglichst genau definieren zu können.

4.3.2.1. PLSCR1 interagiert spezifisch mit mehreren HSV-1 Proteinen

Mit dem vorangegangenen genomweiten Hefe-2-Hybrid *screen* konnte eine Interaktion zwischen dem zellulären Protein PLSCR1 und den HSV-1 Proteinen UL34, UL31 und UL43 identifiziert werden. Die beiden NEC-Proteine UL34 und UL31 sowie deren Interaktion als auch Funktion beim Kernexport der viralen Capside sind innerhalb der *Herpesviridae* hoch konserviert (Chang und Roizman, 1993; Zhu *et al.*, 1999; Farina *et al.*, 2000; Klupp *et al.*, 2000; Roller *et al.*, 2000; Shiba *et al.*, 2000; Dal Monte *et al.*, 2002; Fuchs *et al.*, 2002; Muranyi *et al.*, 2002; Lake und Hutt-Fletcher, 2004; Schnee *et al.*, 2006; Camozzi *et al.*, 2008; Santarelli *et al.*, 2008). Das HSV-1 UL43 Protein ist jedoch nur innerhalb der α - und γ -Herpesviren konserviert, während ein UL43 orthologes Protein bei den β -Herpesviren völlig fehlt (Klupp *et al.*, 2005). Aufgrund dieser konservierten Eigenschaften sollte nun mit Hilfe des Y2H-Systems getestet werden, ob die Wechselwirkungen mit dem Wirtsprotein PLSCR1

auch in anderen Herpesviren auftreten. Hierfür wurden noch einmal die HSV-1 Proteine UL34, UL31 und UL43 sowie deren Orthologe aus VZV (Orf24, Orf27 und Orf15), einem weiteren Vertreter der α -Herpesvirinae, aus MCMV (M50 und M53), einem β -Herpesvirus, und aus den beiden γ -Herpesviren EBV (BFRF1, BFLF2 und BMRF2) sowie KSHV (Orf67, Orf69 und Orf58) verwendet. Die kodierenden Sequenzen wurden aus der Laborkollektion mittels des Gateway®-Systems in Y2H *bait* Vektoren umgesetzt, während das PLSCR1 Gen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M. Kögl, DKFZ, Heidelberg) in einen Y2H *prey* Vektor kloniert wurde. Das Wachstum der diploiden Hefezellen auf Selektivmedium zeigte eindeutig, dass neben den HSV-1 Proteinen auch alle Orthologen aus VZV in der Lage waren, an das Wirtsprotein zu binden, während für MCMV und EBV nur jeweils eine Interaktion identifiziert wurde. Dabei handelte es sich im Fall von MCMV um das UL34-Ortholog M50 und bei EBV um das UL31-Ortholog BFLF2. Für die getesteten KSHV Proteine konnte keine Wechselwirkung beobachtet werden (Abb. 4.22 A).

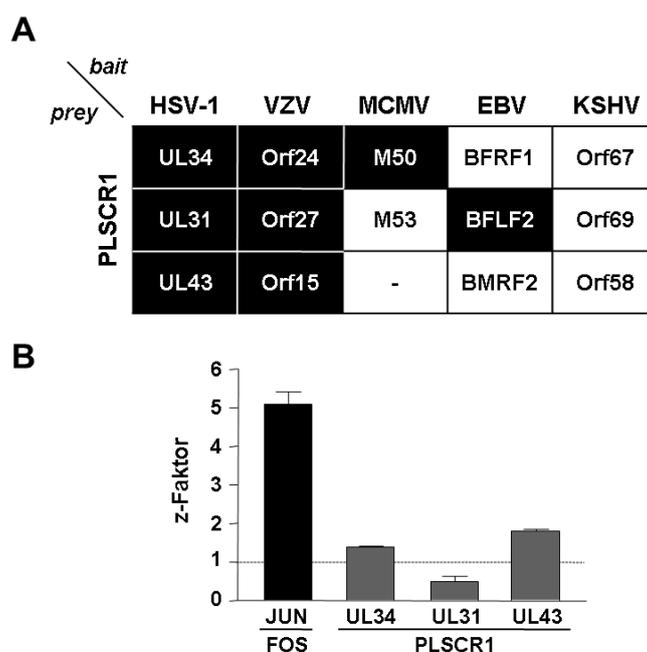


Abbildung 4.22: Die Interaktion zwischen PLSCR1 und den NEC-Proteinen sowie UL43 ist konserviert

A) Die Interaktion von PLSCR1 mit den HSV-1 Proteinen UL34, UL31 und UL43 sowie mit den Orthologen aus VZV, MCMV, EBV und KSHV wurde mittels der Y2H-Methode getestet. Dabei wurde PLSCR1 als Y2H *prey* und die viralen Proteine als Y2H *bait* exprimiert (schwarz = positive Interaktion, weiß = keine Interaktion). **B)** Validierung der Y2H-Interaktionen zwischen PLSCR1 (mit N-terminaler *Renilla Luziferase*) und den HSV-1 Proteinen (mit N-terminalem Protein *A-tag*) mittels LUMIER Assay. Mit den gemessenen Luziferase Werten wurde jeweils der z-Faktor berechnet (siehe Material und Methoden, Abschnitt 3.2.7.3). Ein z-Faktor größer oder gleich 1,0 wurde als positiv gewertet. Als Positivkontrolle diente die Interaktion zwischen Fos und Jun.

Diese Y2H-Analyse wurde analog auch mit zwei weiteren Scramblase Proteinen PLSCR3 und PLSCR4 durchgeführt, wobei beide lediglich mit HSV-1 UL34 und dem VZV-Ortholog Orf24 interagierten (Daten nicht gezeigt). Eine Bindung mit UL43 wurde dagegen nicht

beobachtet, so dass diese vermutlich spezifisch für das PLSCR1 Protein ist. Zuletzt konnte die für MCMV und EBV identifizierte Interaktion mit PLSCR1 auch mit den beiden anderen Scramblase Proteinen bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Somit scheint es, dass die spezifischen Interaktionen zwischen PLSCR1 und UL34, UL31 sowie UL43 innerhalb der α -Herpesviren konserviert und zum Teil auch bei Vertretern der β -Herpesviren sowie γ -Herpesviren zu finden sind.

Im Hinblick auf die folgenden funktionalen Analysen sollten die mittels Y2H identifizierte Interaktionen zwischen PLSCR1 und den HSV-1 Proteinen mit einem modifizierten LUMIER Assay in Kooperation mit M. Kögl (DKFZ, Heidelberg) validiert werden. Die genaue Versuchsdurchführung ist in Material und Methoden unter Abschnitt 3.2.7.3 beschrieben. Aus allen gemessenen LUMIER Werten wurde der sogenannte z-Faktor berechnet, in welchem die Transfektionseffizienz sowie das Hintergrundsignal berücksichtigt wurden. Mit den Ergebnissen des LUMIER Assays konnte die Interaktion von PLSCR1 mit den HSV-1 Proteinen UL34 und UL43 bestätigt werden, da der ermittelte z-Faktor jeweils größer 1 war. Mit dem UL31 Protein wurde jedoch bei diesem Versuchsansatz keine Bindung an PLSCR1 beobachtet (Abb. 4.22 B). Dies könnte daran liegen, dass es sich dabei um eine transiente Wechselwirkung handelt, welche mit dem LUMIER Assay nicht detektiert werden kann, da in diesem System, im Gegensatz zu der Y2H-Methode, nur stabile Protein-Protein-Interaktionen identifiziert werden können.

4.3.2.2. Eingrenzung der Interaktionsdomäne von PLSCR1 mit den HSV-1 Proteinen

Die jeweiligen Interaktionsbereiche des PLSCR1 Proteins mit den HSV-1 Proteinen UL34, UL31 und UL43 sollten durch eine weitere Y2H-Interaktionsstudie genauer eingegrenzt werden. Es wurden bereits mehrere Domänen innerhalb des PLSCR1 Proteins charakterisiert. Dabei handelt es sich um eine TMD innerhalb der C-terminalen TA-Region, eine Kalzium-Bindestelle, eine nicht-klassische NLS Sequenz, ein Cystein-reiches Palmitoylierungsmotiv und schließlich mehrere SH3- (*Src homology 3*) Motive am N-Terminus (Basse *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 2001; Wiedmer *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005). Um herauszufinden, welche funktionalen Bereiche an der Interaktion mit den HSV-1 Proteinen beteiligt sind, wurden PLSCR1 Fragmente generiert, in welchen eine oder mehrere funktionale Domänen fehlten. Die entsprechenden kodierenden Bereiche wurden mit Hilfe des Gateway®-Systems in Y2H *prey* Vektoren kloniert, während die HSV-1 UL34, UL31 und UL43 Gene in Y2H *bait* Vektoren umgesetzt wurden (Abb. 4.23).

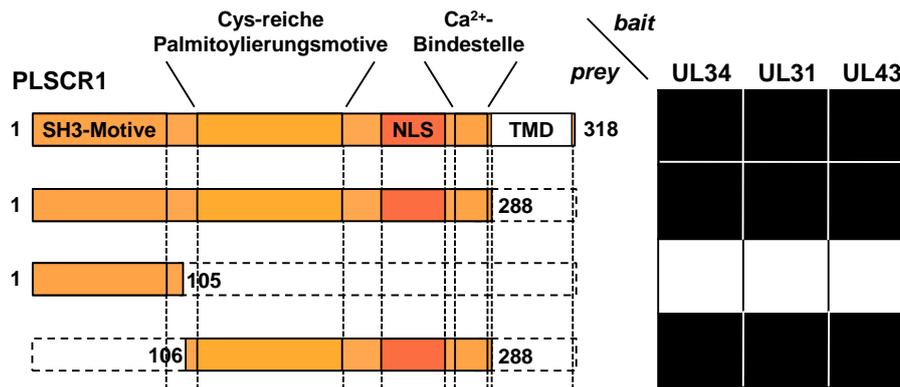


Abbildung 4.23: Eingrenzung des interagierenden Bereiches von PLSCR1 mit den HSV-1 Proteinen

Schematische Darstellung von PLSCR1 Wildtyp und Fragmenten, wobei bereits identifizierte PLSCR1 Domänen angegeben sind. Diese wurden als Y2H *prey* Fusionsproteine exprimiert und auf Interaktion mit HSV-1 UL34, UL31 und UL43, welche als Y2H *bait* Proteine vorlagen, mit Hilfe der Y2H-Methode getestet (schwarz = positive Interaktion, weiß = keine Interaktion).

Die Ergebnisse der Y2H-Analyse zeigten, dass die TA-Region von PLSCR1 für die Bindung aller drei HSV-1 Proteine nicht benötigt wird, da eine C-terminale Verkürzung bis zur Aminosäure 288 toleriert wurde. Überraschenderweise war auch bei einer zusätzlichen N-terminalen Deletion der Aminosäuren 1 bis 105, wobei mehrere Prolin-reiche SH3-Motive entfernt wurden, eine Wechselwirkung mit allen HSV-1 Proteinen noch möglich. Daher scheinen diese SH3-Domänen des PLSCR1 Proteins nicht für die spezifische Interaktion mit den herpesviralen Proteinen verantwortlich zu sein. Folglich konnte auch keine Bindung mehr mit einem PLSCR1 Fragment (As. 1-105), welches ausschließlich die SH3-Motive enthielt, beobachtet werden. Mit dieser Analyse konnte somit die mit den HSV-1 Proteinen UL34, UL31 und UL43 wechselwirkende Region im PLSCR1 Protein auf den Aminosäurebereiche 106 bis 288, in welchem u.a. mehrere Cystein-reiche Palmitoylierungsmotive liegen, eingegrenzt werden.

4.3.2.3. Eingrenzung der Interaktionsdomäne von HSV-1 UL34 mit PLSCR1

Da im Fokus dieser Arbeit vor allem das HSV-1 TA-Protein UL34 steht, sollte nun in diesem Protein auch der Interaktionsbereich mit PLSCR1 genauer eingegrenzt werden. Dazu wurden mehrere bereits vorhandene UL34 Fragmente als Y2H *bait* Fusionsproteine exprimiert und auf Interaktion mit PLSCR1, welches als Y2H *prey* Protein vorlag, im Hefe-2-Hybridsystem getestet (Abb. 4.24). Dabei konnte noch bei einer C-terminalen Verkürzung von UL34 bis zur Aminosäure 147, wodurch der *tail anchor* sowie ein Großteil der UL31-Interaktionsdomäne deletiert wurde, eine positive Wechselwirkung mit PLSCR1 beobachtet werden. Eine N-terminale Verkürzung von UL34 um 50 bzw. 74 Aminosäuren jedoch führte zum Verlust dieser Interaktion.

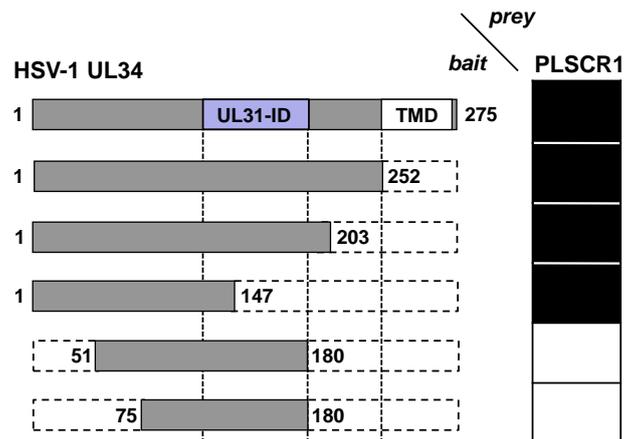


Abbildung 4.24: Eingrenzung des interagierenden Bereiches von HSV-1 UL34 mit PLSCR1

Schematische Darstellung von HSV-1 UL34 Wildtyp und Fragmente, wobei bereits identifizierte UL34 Domänen angegeben sind. Diese wurden als Y2H *bait* Fusionsproteine exprimiert und auf Interaktion mit PLSCR1, welches als Y2H *prey* Protein vorlag, mit Hilfe der Y2H-Methode getestet (schwarz = positive Interaktion, weiß = keine Interaktion).

Folglich liegt die PLSCR1 Interaktionsdomäne im N-terminalen Bereich des HSV-1 UL34 Proteins und kann sicher auf die Aminosäuren 1 bis 147 eingegrenzt werden, wobei vor allem die ersten 75 Aminosäuren des N-Terminus benötigt werden. Eine Überlappung mit den HSV-1 UL31-interagierenden Bereichen ist daher unwahrscheinlich.

4.3.2.4. HSV-1 induziert die subzelluläre Umverteilung von PLSCR1

Eine subzelluläre Umverteilung des PLSCR1 Proteins von der Plasmamembran zum Zellkern konnte unter bestimmten Bedingungen bereits gezeigt werden (Zhou *et al.*, 2000; Wiedmer *et al.*, 2003). Als nächstes sollte deshalb die Frage geklärt werden, wo das PLSCR1 Protein während der HSV-1 Infektion in der Zelle zu finden ist. Dafür wurde zuerst mittels indirekter Immunofluoreszenz die Verteilung von endogenem PLSCR1 in unbehandelten Hela Zellen bestimmt. Dabei konnte gezeigt werden, dass dieses an der Plasmamembran, vor allem aber am TGN lokalisierte, wie die Kolo-kalisierung mit dem humanen TGN46-Marker zeigte (Abb. 4.25).

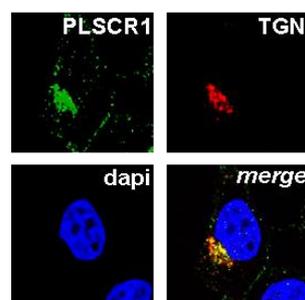


Abbildung 4.25: Subzelluläre Verteilung von endogenem PLSCR1

Die subzelluläre Lokalisation von endogenem PLSCR1 wurde in Hela Zellen mittels indirekter Immunofluoreszenz unter Verwendung eines polyklonalen Ziege-anti-PLSCR1 (grün) und eines polyklonalen Kaninchen-anti-*human* TGN46 Antikörpers (rot) bestimmt. Die Zellkerne wurden mittels Dapi-Färbung (blau) visualisiert.

Um die subzelluläre Lokalisation des PLSCR1 Proteins während der HSV-1 Infektion zu verfolgen, wurden Hela Zellen mit HSV-1 (F) mit einer MOI von 1 infiziert und nach 12 h mit indirekter Immunofluoreszenz unter Verwendung von PLSCR1- und ICP8-spezifischen Antikörpern analysiert. Dabei konnten bei den infizierten Zellen unterschiedliche ICP8-Färbemuster beobachtet werden, welche den verschiedenen Entwicklungsstadien der Replikationszentren entsprachen. Dies diente als Anhaltspunkt, um den Infektionsverlauf zeitlich einordnen zu können. Abbildung 4.26 zeigt repräsentative Bilder der Immunofluoreszenz-Analyse.

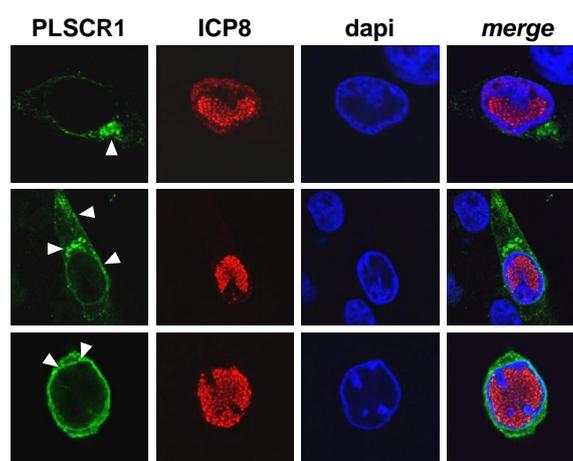


Abbildung 4.26: Die subzelluläre Verteilung des PLSCR1 Proteins ändert sich während der HSV-1 Infektion

Hela Zellen wurden mit HSV-1(F) (MOI 1) für 12 h infiziert und anschließend mittels indirekter Immunofluoreszenz unter Verwendung eines polyklonalen anti-PLSCR1 (grün) und eines monoklonalen anti-ICP8 Antikörpers (rot) analysiert. Die Zellkerne wurden mittels Dapi-Färbung (blau) visualisiert. Es sind verschiedene Entwicklungsstadien der Replikationszentren, welche durch ICP8 detektiert wurden, dargestellt. Die subzelluläre Verteilung von endogenem PLSCR1 ist durch weiße Pfeile markiert.

In der frühen Infektion konnte eine den unbehandelten Zellen vergleichbare Lokalisierung von PLSCR1 hauptsächlich am TGN gefunden werden (Abb. 4.26 oben). Im weiteren HSV-1 Infektionsverlauf konnte jedoch eine subzelluläre Umverteilung des PLSCR1 Proteins sowie eine Zunahme des Fluoreszenzsignals beobachtet werden, was vermutlich auf die erhöhte Expression von PLSCR1 während der Infektion zurückzuführen ist (Abb. 4.26 Mitte). Dieses lokalisierte zusätzlich zum TGN und der Plasmamembran auch an der Kernperipherie und im Cytoplasma. Spät in der Infektion befand sich das PLSCR1 Protein ausschließlich an der Kernmembran. Die aufgrund der Bildung der Replikationszentren entstandene Komprimierung und Marginalisierung des Chromatins ist hierbei deutlich sichtbar (Abb. 4.26 unten). Somit scheint es, dass durch die HSV-1 Infektion eine subzelluläre Umverteilung des PLSCR1 Proteins induziert wird. Eine Lokalisation an der Kernperipherie und am TGN stimmt auch gut mit der Tatsache überein, dass PLSCR1 als Interaktor mit den herpesviralen Proteinen UL34 und UL31 gefunden wurde, welche den NEC an der Kernmembran bilden

sowie mit dem HSV-1 UL43 Protein, welches nach transienter Expression am TGN lokalisierte (Daten nicht gezeigt).

4.3.2.5. *Silencing* der PLSCR1 Expression mittels RNA Interferenz

Mit Hilfe eines genomweiten, funktionalen RNA Interferenz *screens* konnte bereits gezeigt werden, dass das PLSCR1 Protein die HSV-1 Replikation signifikant beeinflusst (J. Haas, unpublizierte Daten). Um die Rolle dieses Wirtsfaktors im herpesviralen Lebenszyklus näher zu definieren, wurden wie schon zuvor bei der Analyse des TA-Insertionsfaktors Asna1 mehrere funktionale Assays basierend auf RNA Interferenz durchgeführt. Dabei muss eine erfolgreiche Suppression der PLSCR1 Expression durch die spezifische PLSCR1-siRNA gewährleistet werden. Zur Überprüfung des *Silencing* Erfolges wurden Hela Zellen mit einem PLSCR1-spezifischen siRNA *Pool* sowie mit Kontroll-siRNA für 48 h transfiziert, anschließend Zellysate hergestellt und mittels SDS-PAGE und Immunoblot jeweils die Menge an PLSCR1 (37 kDa) unter Verwendung eines PLSCR1-spezifischen Antikörpers detektiert (Abb. 4.27).

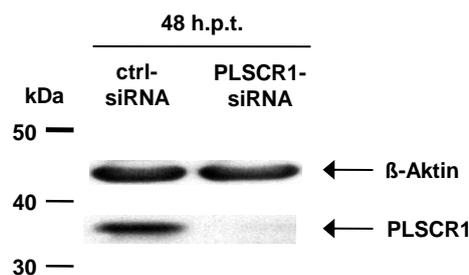


Abbildung 4.27: Analyse des *Silencing* Erfolges von PLSCR1 mittels Immunoblot

48h nach Transfektion wurden Zellysate von PLSCR1- bzw. Kontroll- (ctrl-) siRNA behandelten Hela Zellen hergestellt und im SDS-Gel (10%) aufgetrennt. Anschließend wurde mittels Immunoblot die Detektion von PLSCR1 (37 kDa) unter Verwendung eines monoklonalen anti-PLSCR1 Antikörpers und eines entsprechenden Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers durchgeführt. Als Ladekontrolle wurde die obere Blothälfte (ab 40 kDa) für die Detektion von β -Aktin (42 kDa) analog mit einem monoklonalen anti- β -Aktin Antikörper inkubiert.

Mit dem Immunoblot konnte ein nahezu 100%-iges *Silencing* von PLSCR1 nach Transfektion von spezifischer siRNA im Vergleich zur Kontroll-siRNA gezeigt werden. Eine Variation in der Auftragsmenge der Proben konnte durch ein gleichbleibend starkes β -Aktin-Signal (42 kDa) ausgeschlossen werden. Demzufolge wurde mit der verwendeten PLSCR1-siRNA ein effizientes und auch homogenes *Silencing* der PLSCR1 Expression erreicht. Eine Beeinträchtigung der Hela Zellen in ihrer Lebensfähigkeit aufgrund der durchgeführten siRNA Behandlung konnte nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Im Folgenden sollten nun mögliche Funktionen des zellulären Proteins PLSCR1 in Bezug auf einzelne Schritte des herpesviralen Replikationszyklus mit Hilfe von RNA Interferenz analysiert werden. Der *Silencing* Erfolg wurde hierbei zwar bei jedem siRNA-Experiment wie eben mittels Immunoblot kontrolliert, jedoch nicht mehr explizit gezeigt.

4.3.2.6. PLSCR1 spielt keine Rolle beim Eintritt der HSV-1 Virionen in die Wirtszelle

Der erste Schritt der herpesviralen Replikation, der Eintritt in die Wirtszelle, beginnt mit der Adsorption der Viruspartikel und anschließenden Fusion ihrer Virushülle mit zellulären Membranen. Diese weisen unter normalen Bedingungen zwischen ihren beiden Lipid-schichten eine asymmetrische Verteilung der Phospholipide auf. Für viele biologische Prozesse wie z.B. Apoptose, Signaltransduktion sowie für die Krümmung und Fusion von Membranen ist jedoch eine zumindest lokal auftretende Auflösung dieser Asymmetrie eine wichtige Voraussetzung. Seit längerem wird dabei vermutet, dass PLSCR1 als sogenannte Phospholipid Scramblase für die schnelle und unspezifische Umverteilung von Phospholipiden verantwortlich sein könnte (Basse *et al.*, 1996). Ob nun PLSCR1 und etwaige Lipidveränderungen den Eintritt der HSV-1 Virionen in die Wirtszelle beeinflusst, sollte durch eine detaillierte Analyse untersucht werden. Dazu wurden Hela Zellen mit Kontroll- bzw. PLSCR1-siRNA behandelt und nach 48 h mit HSV-1(F) mit einer MOI von 0,5 infiziert. Durch indirekte Immunfluoreszenz nach 4 h wurden die infizierten Zellen mit Hilfe eines ICP0-spezifischen Antikörpers detektiert und anschließend jeweils 700 Zellen ausgezählt, um die Anzahl primär infizierter Zellen zu bestimmen. Die statistische Auswertung zeigte, dass 20% der Kontrollzellen und auch 19,7% der PLSCR1 depletierten Zellen primär infiziert waren (Abb. 4.28 A). Dies deutet darauf hin, dass PLSCR1 vermutlich keine wichtige Funktion beim Eintritt der HSV-1 Virionen übernimmt.

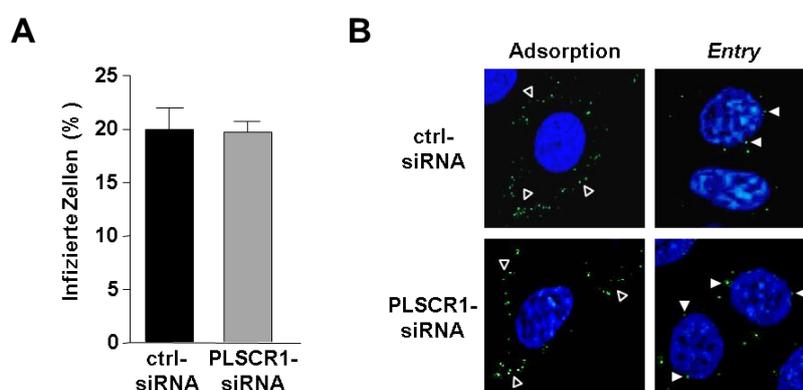


Abbildung 4.28: PLSCR1 wird nicht für den Virus-Eintritt in HeLa Zellen benötigt

A) Um den Virus-Eintritt unter Abwesenheit von PLSCR1 zu kontrollieren, wurden HeLa Zellen mit Kontroll- (ctrl-) bzw. PLSCR1-siRNA behandelt, nach 48 h mit HSV-1(F) (MOI 0,5) für 4 h infiziert und mittels indirekter Immunofluoreszenz unter Verwendung eines monoklonalen anti-ICP0 Antikörpers analysiert. Die Zellkerne wurden durch Dapi-Färbung (blau) visualisiert. Insgesamt wurden jeweils 700 Zellen statistisch ausgewertet (ICP0 positiv = infizierte Zelle). **B)** HeLa Zellen wurden nach 48 h ctrl- bzw. PLSCR1-siRNA Behandlung mit HSV-1(17⁺)blueLox-GFPVP26 (in RPMI-Medium + 0,2% BSA) für 2 h bei 4°C synchron inokuliert (MOI 10). Um den Einfluss von PLSCR1 auf die Adsorption zu untersuchen, wurden die Zellen anschließend sofort fixiert und für die Mikroskopie prozessiert. Zur Analyse des Virus-Eintritts wurden die Zellen für 1 h bei 37°C weiter inkubiert, die extrazellulären Virionen durch Waschen mit 40 mM Zitronensäure, 135 mM NaCl, 10 mM KCl (pH 3) inaktiviert und anschließend die Proben analog wie oben prozessiert. Die HSV-1 Capside wurden dabei mittels GFP-tag (grün) und die Zellkerne mittels Dapi-Färbung (blau) visualisiert (weiß umrandetes Dreieck = Plasmamembran-assoziierte HSV-1 Capside; weiß gefülltes Dreieck = Zellkern-nahe HSV-1 Capside).

Zusätzlich wurde der Virus-Eintritt mit Hilfe eines von B. Sodeik und Mitarbeitern generierten HSV-1(17⁺)blueLox-GFPVP26 nochmals im Detail charakterisiert. Hierbei wurde durch die Fusion eines GFP-Moleküls an den N-Terminus des kleinen Capsidproteins VP26 die Analyse der intrazellulären Verteilung von einzelnen HSV-1 Capsiden ermöglicht, ohne dabei die Kinetik der ersten herpesviralen Replikationsschritte zu beeinträchtigen (Nagel *et al.*, 2008). In diesem Experiment sollte die Adsorption der Viruspartikel und der anschließende Virus-Eintritt jeweils einzeln betrachtet werden. Dazu wurden Hela Zellen wie oben beschrieben mit siRNA behandelt und anschließend mit HSV-1(17⁺)blueLox-GFPVP26 mit einer MOI von 10 für 2 h bei 4°C infiziert, um eine überwiegend synchrone Infektionssituation zu erhalten. Um allein die Adsorption unter PLSCR1-depletierten Bedingungen zu untersuchen, wurden die Hela Zellen anschließend sofort fixiert und für die Konfokalmikroskopie prozessiert. Durch eine weitere Stunde Inkubation der infizierten Zellen bei 37°C konnte auch der darauffolgende Eintritt der Viruspartikel beobachtet werden. Dabei wurden die Zellen vor der Fixierung mit 40 mM Zitronensäure, 135 mM NaCl, 10 mM KCl (pH 3) gewaschen, um noch extrazellulär vorhandene Virionen zu inaktivieren (Nagel *et al.*, 2008). Abbildung 4.28 B zeigt eine repräsentative Auswahl der Immunfluoreszenz-Bilder. Im Adsorptionsverhalten konnte kein Unterschied zwischen den PLSCR1-depletierten Zellen und den Kontrollzellen beobachtet werden. In beiden Fällen waren vergleichbar viele punktartige GFP-Signale entlang der Plasmamembran zufällig verteilt, die wahrscheinlich jeweils ein HSV-1 Capsid repräsentieren. Da die Inkubation des Virusinokulums bei 4°C ein Voranschreiten des Virus-Eintritts d.h. die Fusion mit der Plasmamembran verhindert, befanden sich auch nur wenige Capside bzw. Viruspartikel bereits intrazellulär. Auch die anschließende Fusion und der tatsächliche Eintritt in die Wirtszelle wurde durch das Fehlen des PLSCR1 Proteins nicht beeinträchtigt, da unter beiden siRNA Bedingungen ähnlich viele GFP-markierte Capside im Inneren der Zelle detektiert werden konnten. Ebenso wurden diese unter beiden Bedingungen effizient zum Zellkern transportiert.

Durch die Konfokalmikroskopie mit direkt markierten Viruspartikeln konnten somit die zuvor gewonnenen Eindrücke bestätigt werden. Aufgrund dieser Daten wird geschlossen, dass die Scramblase Aktivität von PLSCR1 oder auch andere Funktionen des Proteins für den Eintritt der Herpesviren nicht von Bedeutung sind.

4.3.2.7. PLSCR1 wird für die effiziente HSV-1 Vermehrung benötigt

Mit den vorangegangenen Y2H-Interaktionsstudien konnte eine Wechselwirkung von PLSCR1 mit den HSV1 Proteinen UL34, UL31 und auch UL43 gezeigt werden. Ob PLSCR1 aufgrund dieser Interaktionen bzw. überhaupt wichtige Funktionen bei der herpesviralen Replikation übernimmt, sollte nun durch die genaue Bestimmung der Wachstumskinetik in Abwesenheit von PLSCR1 herausgefunden werden. Dafür wurden Hela Zellen mit Kontroll- und PLSCR1-siRNA behandelt und nach 48 h mit HSV-1(F) mit einer MOI von 0,1 für 45 h

infiziert. An mehreren Zeitpunkten wurde der Kulturüberstand abgenommen und die Anzahl der freigesetzten infektiösen Viruspartikel mittels *Plaque Assay* bestimmt.

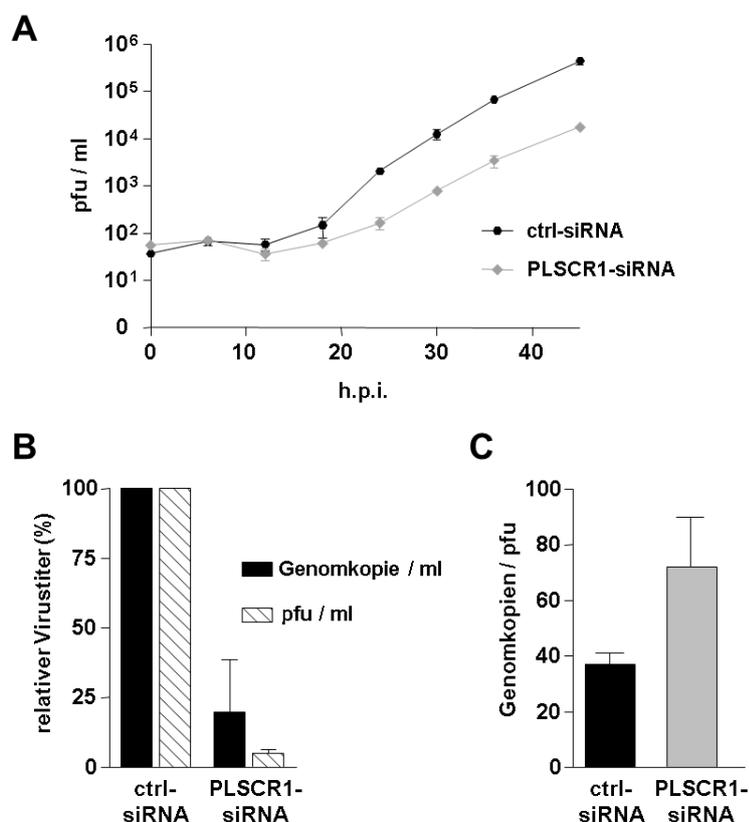


Abbildung 4.29: PLSCR1 beeinflusst die Virusreplikation sowie Infektiosität der HSV-1 Virionen
A) Um eine mögliche Rolle von PLSCR1 im HSV-1 Infektionsverlauf zu untersuchen, wurden Hela Zellen 48 h mit Kontroll- (ctrl-) bzw. PLSCR1-siRNA behandelt und anschließend mit HSV-1(F) (MOI 0,1) in Triplikaten infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion (h.p.i.) wurde der Kulturüberstand abgenommen und die Anzahl der freigesetzten Virionen (pfu/ml) mittels *Plaque Assay* bestimmt. **B)** Um die virale DNA-Replikation zu analysieren, wurden Hela Zellen 48 h mit ctrl- bzw. PLSCR1-siRNA behandelt und anschließend mit HSV-1(F) (MOI 0,1) infiziert. 30 h.p.i. wurde im Kulturüberstand die Anzahl viraler Genomkopien mittels *realtime* qPCR sowie der Virustiter (pfu/ml) mittels *Plaque Assay* in Triplikaten bestimmt und auf die ctrl-Werte normalisiert. **C)** Mit den in B) ermittelten Werten wurde das Genomkopien / pfu- Verhältnis bestimmt.

Die Wachstumskurven zeigten, dass mit Beginn der exponentiellen Phase unter PLSCR1 supprimierten Bedingungen um etwa ein bis zwei Zehnerpotenzen weniger Virionen ins extrazelluläre Milieu freigesetzt wurden als bei den Kontrollzellen. Dieses Ergebnis deutet somit bereits auf eine Rolle von PLSCR1 bei der HSV-1 Virusreplikation hin (Abb. 4.29 A). Zusätzlich wurde nach 30 h Infektion die Anzahl viraler Genomkopien im Kulturüberstand mittels *realtime* quantitativer PCR sowie die Anzahl infektiöser Viruspartikel mittels *Plaque Assay* bestimmt. Dabei zeigte sich, dass unter PLSCR1-siRNA Bedingungen die Menge an freigesetzten HSV-1 Genomkopien nur noch etwa 20% der ermittelten Kontrollwerte entsprach. Die Infektiosität der extrazellulären Virionen nahm in PLSCR1 depletierten Zellen im Vergleich zu den Genomkopien sogar noch drastischer ab, da eine bis zu 20 fache

Verringerung im Virustiter beobachtet werden konnte, d.h. im Vergleich zu den Kontroll-siRNA behandelten Zellen waren nur noch 5% infektiöse Viruspartikel enthalten (Abb. 4.29 B). Aufgrund dieser unterschiedlich starken Reduktion ergab sich eine Verdopplung des Genomkopien / *plaque forming unit* (pfu) -Verhältnisses unter PLSCR1 supprimierten Bedingungen. Es waren also etwa 50% weniger extrazelluläre Virionen tatsächlich infektiös (Abb. 4.29 C).

Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass in Abwesenheit des zellulären Proteins PLSCR1 die infektiöse Eigenschaft der extrazellulären HSV-1 Viruspartikel deutlich beeinträchtigt war. Zudem konnte in Abwesenheit des zellulären Proteins auch eine allgemein verringerte Freisetzung der Viruspartikel beobachtet werden. Da der Eintritt der HSV-1 Virionen dabei jedoch nicht beeinträchtigt ist, wäre es denkbar, dass PLSCR1 womöglich an der Bildung der Nukleocapside oder an der anschließenden Auswanderung aus der Wirtszelle beteiligt ist, was im Folgenden durch weitere Experimente näher untersucht werden sollte.

4.3.2.8. PLSCR1 beeinflusst die Bildung von neuen HSV-1 Virionen

Aufgrund der bereits beschriebenen nukleären Funktion von PLSCR1 bei der transkriptionalen Genregulation wäre es auch vorstellbar, dass dieses Protein Einfluss auf die herpesvirale Genexpression nehmen kann (Ben-Efraim *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2005). Um dieser Frage nachzugehen, wurde in Abwesenheit des PLSCR1 Proteins über einen Zeitraum von 12 h.p.i. zuerst die Expression von mehreren HSV-1 Proteinen mit unterschiedlichen Expressionskinetiken überprüft. Dazu wurden an den jeweiligen Zeitpunkten Lysate von siRNA behandelten Hela Zellen hergestellt und im Immunoblot analysiert. Zur Detektion wurden die HSV-1 Proteine ICP0 und ICP27 als *immediate early* Proteine, Glykoprotein B (gB) als *early* Protein sowie UL34 und VP5 als *late* Proteine exemplarisch verwendet. Als Ladekontrolle diente hierbei der Nachweis des zellulären Proteins β -Aktin, welches sich bei allen aufgetragenen Proben als ein gleichmäßig starkes Blotsignal zeigte (Abb. 4.30 A). Der jeweilige Vergleich der detektierten Proteinmengen zwischen Kontroll- und PLSCR1-siRNA behandelten Zellen zeigte bereits bei optischer Einschätzung, dass in Abwesenheit von PLSCR1 die Expression von allen getesteten HSV-1 Proteinen mit Ausnahme von ICP27 wesentlich verringert war. Für das gB Protein konnte jedoch nur ein geringer Unterschied beobachtet werden und auch die UL34 Proteinexpression war hauptsächlich zwischen 8 und 10 h.p.i. sichtbar reduziert. Am deutlichsten zeigte sich der Effekt beim VP5 Protein, da im Gegensatz zu den Kontrollzellen auch nach 12 h.p.i. kaum Protein exprimiert wurde. Überraschenderweise wurde in der Gruppe der *immediate early* Proteine nur die Expression von ICP0 durch das Fehlen von PLSCR1 beeinträchtigt, während für das ICP27 Protein kein signifikanter Unterschied beobachtet werden konnte (Abb. 4.30 A).

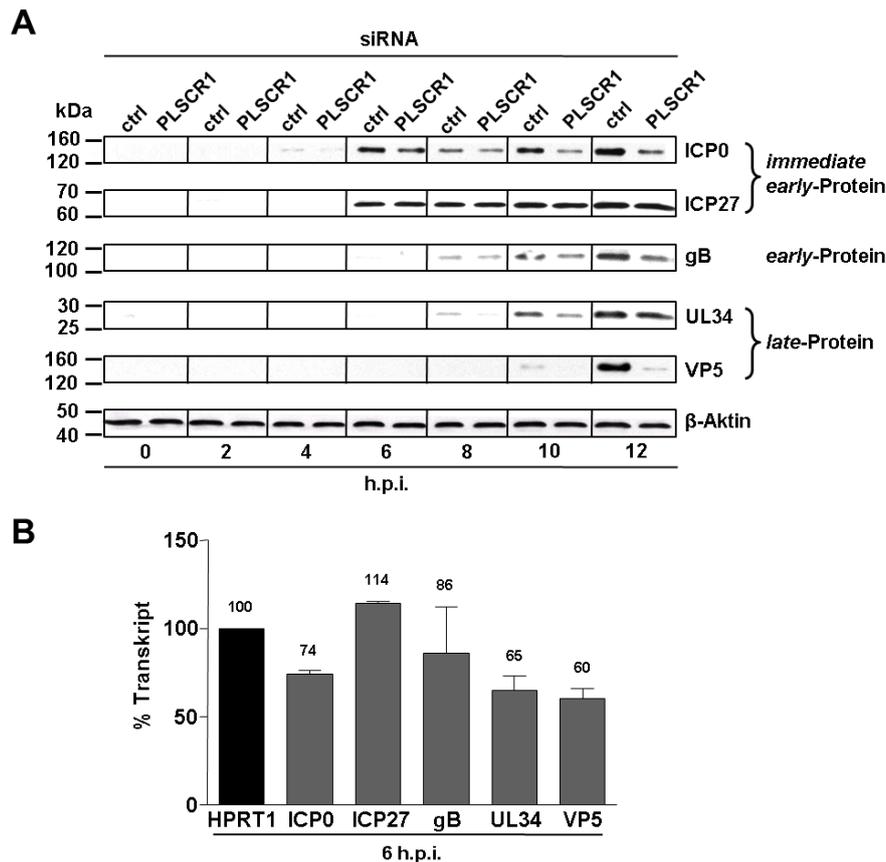


Abbildung 4.30: In Abwesenheit von PLSCR1 ist die herpesvirale Genexpression reduziert

A) Zur Untersuchung der viralen Proteinexpression wurden PLSCR1- bzw Kontroll- (ctrl-) siRNA behandelte Hela Zellen nach 48 h mit HSV-1(F) (MOI 1) für 12 h infiziert, zu den angegebenen Zeitpunkten Zelllysate hergestellt und mittels Immunoblot mit Hilfe von ICP0, ICP27, Glycoprotein B (gB), UL34 und VP5 spezifischen Antikörpern analysiert. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von β -Aktin analog mit einem β -Aktin spezifischen Antikörper. **B)** Zur Analyse der HSV-1 Transkription wurden Hela Zellen nach PLSCR1- bzw. ctrl-siRNA Behandlung mit HSV-1(F) für 6 h in Triplikaten infiziert (MOI 1), die Gesamt-RNA aus den Zelllysaten isoliert und revers transkribiert. Mittels *realtime* qPCR unter Verwendung der *Universal Probe Library* (Roche) wurde die veränderte Transkriptmenge von ICP0, ICP27, gB, UL34 und VP5 in PLSCR1- gegenüber ctrl-siRNA behandelten Hela Zellen nach Normalisierung auf das HPRT1-Transkript bestimmt.

Der Einfluss von PLSCR1 auf die herpesvirale Genexpression wurde nicht nur auf Proteinebene, sondern zusätzlich auch durch die Bestimmung der jeweiligen Transkriptmenge analysiert. Hierfür wurden, analog wie eben beschrieben, Zelllysate hergestellt. Da die RNA-Transkripte der untersuchten Gene zeitlich früher in der Zelle vorhanden sind als die entsprechenden Genprodukte, wurden die Zelllysate zusätzlich auch bereits nach 6 h Infektion genommen und daraus die Gesamt-RNA isoliert. Diese wurde anschließend durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und mittels *realtime* quantitativer PCR unter Verwendung von spezifischen Primern und Sonden (siehe Abschnitt 3.1.7.7) die veränderte Transkriptmenge von ICP0, ICP27, gB, UL34 und VP5 in PLSCR1- gegenüber ctrl-siRNA behandelten Hela Zellen bestimmt. Zur Normalisierung der eingesetzten Transkriptmenge wurde zusätzlich das konstitutiv exprimierte *housekeeping gene* Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT1) detektiert. Die Ergebnisse der Echtzeit-PCR-

Quantifizierung zeigen, dass in Abwesenheit von PLSCR1 auch die gebildete Transkriptmenge der untersuchten HSV-1 Proteine ICP0, gB, UL34 und VP5 im Vergleich zu den Kontrollzellen reduziert war. Es konnte dabei kein Unterschied zwischen den zwei untersuchten Zeitpunkten beobachtet werden, so dass nur die Ergebnisse nach 6 h Infektion dargestellt sind (Abb. 4.30 B). Auch hier war wieder der stärkste Effekt beim Transkript des VP5 Proteins zu sehen, welches nur noch 60% der Transkriptmenge von Kontrollzellen entsprach, während gB nur einen sehr geringen Unterschied mit starken Schwankungen aufwies. Lediglich für das ICP27 Protein konnte wie schon im Immunoblot keine signifikante Veränderung beobachtet werden. Diese Ergebnisse stimmen demnach gut mit den Beobachtungen des Immunoblots überein, die gezeigt hatten, dass in Abwesenheit des PLSCR1 Proteins die allgemeine herpesvirale Genexpression deutlich reduziert ist.

Mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurde nun untersucht, ob prinzipiell auch ohne das PLSCR1 Protein ein vollständiger HSV-1 Replikationsverlauf möglich ist. Die TEM-Analyse wurde in Kooperation mit B. Klupp und H. Granzow am Institut von T. C. Mettenleiter (Friedrich-Loeffler-Institut, Greifswald - Insel Riems, D) durchgeführt. Dafür wurden Hela Zellen zuerst mit siRNA behandelt, nach 48 h mit HSV-1(F) mit einer MOI von 1 infiziert und 15 h unter Standardbedingungen inkubiert und anschließend für die TEM prozessiert (siehe Abschnitt 3.2.9.2). Dabei konnten auch in PLSCR1 depletierten Zellen reife HSV-1 Virionen im extrazellulären Milieu beobachtet werden, welche in ihrer Morphologie den gebildeten Virionen der Kontrollzellen vergleichbar waren (Abb. 4.31).

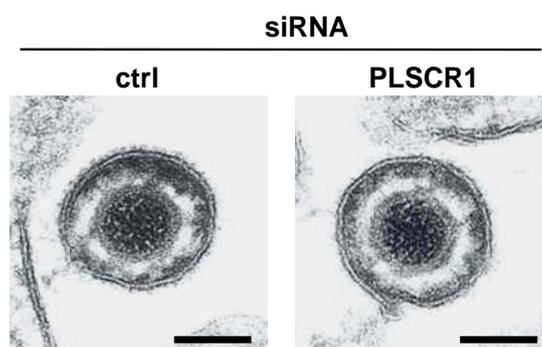


Abbildung 4.31: TEM-Analyse der extrazellulären HSV-1 Virionen nach siRNA-Behandlung
 PLSCR1- bzw ctrl-siRNA behandelte Hela Zellen wurden mit HSV-1(F) für 15 h unter Standardbedingungen infiziert (MOI 1) und anschließend für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) prozessiert (siehe Material und Methoden, Abschnitt 3.2.9.2). Dargestellt ist jeweils ein extrazelluläres Viruspartikel (schwarzer Balken = 100 nm).

Zusammenfassend weisen diese Daten darauf hin, dass PLSCR1 vermutlich primär die herpesvirale Genexpression beeinflusst und somit für die zahlreiche und effiziente Bildung von neuen HSV-1 Nukleocapsiden bzw. Virionen benötigt wird. Damit könnte auch die beobachtete verringerte Freisetzung von reifen HSV-1 Virionen in Abwesenheit des Wirtsfaktors erklärt werden.

4.3.2.9. PLSCR1 spielt eine Rolle bei der Auswanderung der HSV-1 Virionen

Schließlich sollte getestet werden, ob PLSCR1 einen Einfluss auf die Auswanderung der HSV-1 Virionen aus der Wirtszelle hat. Dafür wurde die Wachstumskinetik der HSV-1 Infektion mit und ohne PLSCR1 *Silencing* noch einmal, analog wie in Abschnitt 4.3.2.7 beschrieben, verfolgt. Zusätzlich wurde jedoch zu jedem Zeitpunkt auch das Zellpellet entnommen, um nach erfolgtem Zellaufschluss die Menge an reifen intrazellulären Viren mittels *Plaque Assay* quantifizieren zu können. Die Zeitverläufe der extrazellulären Proben zeigten, dass in Abwesenheit von PLSCR1 bis zu hundertmal weniger infektiöse Viruspartikel als bei den Kontrollzellen freigesetzt wurden, wie es auch schon in Abbildung 4.29 A gezeigt wurde. Dabei war vor allem zu den späteren Zeitpunkten eine deutliche Attenuierung zu erkennen. Auch die Menge an infektiösen intrazellulären Virionen war in PLSCR1 depletierten Zellen über den gesamten Zeitverlauf um etwa das Vierfache im Vergleich zu den Kontroll-siRNA behandelten Zellen reduziert (Abb. 4.32 A). Diese verringerte Virusbildung stimmt mit den zuvor gezeigten Beobachtungen, dass PLSCR1 an der herpesviralen Genexpression beteiligt ist, gut überein. Zusätzlich deutet die drastische Abnahme an extrazellulären Virionen unter PLSCR1 supprimierten Bedingungen darauf hin, dass dieses zelluläre Protein nicht nur für die Bildung der HSV-1 Virionen, sondern auch bei deren Auswanderung aus der Wirtszelle benötigt wird.

Mit den durchgeführten Interaktionsstudien konnte zu Beginn gezeigt werden, dass PLSCR1 u.a. mit den α -herpesviralen NEC-Proteinen UL34 und vermutlich auch UL31 spezifisch interagiert. Da PLSCR1 unter bestimmten Bedingungen auch nukleär lokalisiert vorliegt, könnte es daher auch gemeinsam mit den viralen Proteinen an der Kernauswanderung der Capside beteiligt sein. Die Analyse der subzellulären Lokalisation von UL34 in PLSCR1 depletierten Zellen sollte dafür erste Hinweise liefern. Dazu wurden siRNA behandelte Hela Zellen nach 48 h mit HSV-1(F) mit einer MOI von 1 für 12 h infiziert und anschließend mittels indirekter Immunfluoreszenz unter Verwendung von UL34- und ICP8-spezifischen Antikörpern untersucht. Die Immunfluoreszenz-Bilder zeigten, dass UL34 zwar unter beiden Bedingungen überwiegend an der Kernperipherie lokalisierte, jedoch in Abwesenheit von PLSCR1 eine extreme Veränderung der Zellkerne zu beobachten war. Während die Zellkerne bei den Kontrollzellen eine gleichmäßig ovale Morphologie mit einer glatten Kernmembran aufwiesen, waren diese nach PLSCR1 Depletion drastisch deformiert (Abb. 4.32 B). Diese Beobachtung wurde auch bei der Detektion von Lamin B gemacht, welches an der inneren Kernmembran assoziiert vorliegt. Zusätzlich konnte mit diesem Versuchsansatz auch ein Unterschied in der Bildung von viralen Replikationszentren, welche durch das ICP8 Protein markiert wurden, festgestellt werden. Diese waren in Abwesenheit von PLSCR1 kleiner und vor allem dezentraler im Zellkern vorhanden. Um herauszufinden, ob die Depletion von PLSCR1 allein schon für diese auffällige Deformation des Zellkerns bzw.

der Kernmembran verantwortlich ist, wurde Lamin B auch in nicht-infizierten, jedoch siRNA behandelten Hela Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz detektiert. Im Gegensatz zu HSV-1 infizierten Zellen war keine veränderte Kernmorphologie auch unter PLSCR1 supprimierten Bedingungen zu beobachten (Abb. 4.32 C).

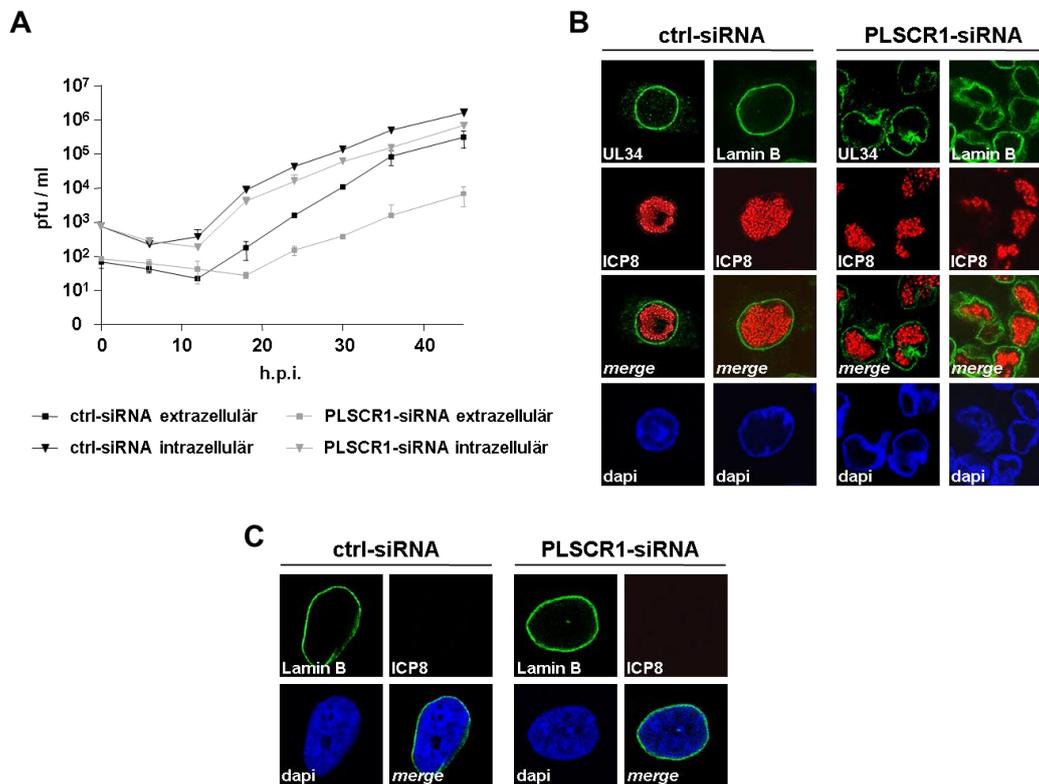


Abbildung 4.32: PLSCR1 beeinflusst die Auswanderung neu gebildeter HSV-1 Virionen

A) Hela Zellen wurden mit Kontroll- (ctrl-) bzw. PLSCR1-siRNA behandelt und nach 48 h mit HSV-1(F) (MOI 0,1) in Triplikaten infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion (h.p.i.) wurden mittels *Plaque Assay* die Virustiter (pfu/ml) sowohl von den freigesetzten Virionen (aus dem Kulturüberstand) als auch von den Zell-assoziierten Virionen (nach Aufschluss der Zellpellets) bestimmt. Die Kinetik der Virusfreisetzung (extrazellulär) ist als Viereck und die der Virusbildung (intrazellulär) als Dreieck dargestellt. **B)** Zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation von HSV-1 UL34 wurden Hela Zellen nach 48 h siRNA Behandlung mit HSV-1(F) infiziert (MOI 1) und 12 h.p.i. eine indirekte Immunfluoreszenz unter Verwendung eines polyklonalen anti-UL34 bzw. anti-LaminB (beide grün) in Kombination mit einem monoklonalen anti-ICP8 (rot) Antikörper durchgeführt. Die Zellkerne wurden mittels Dapi-Färbung (blau) visualisiert. **C)** LaminB wurde auch in siRNA behandelten, jedoch nicht-infizierten Hela Zellen detektiert. Dazu wurde eine indirekte Immunfluoreszenz Analyse unter Verwendung eines polyklonalen anti-LaminB (grün) und monoklonalen anti-ICP8 (*mock* Kontrolle) Antikörpers durchgeführt. Die Zellkerne wurden mittels Dapi-Färbung (blau) visualisiert.

Aufgrund dieses vom Virus induzierten auffälligen Phänotyps des Zellkerns unter PLSCR1-depletierten Bedingungen liegt die Vermutung nahe, dass PLSCR1 für den *nuclear egress* der Capside von Bedeutung sein könnte. Ob es direkt daran beteiligt ist und die Kernhülledynamik bzw. deren Interaktion mit Chromatin beeinflusst und damit indirekte Auswirkungen auf den *nuclear egress* der Capside hat, ist für zukünftige Ansätze von großem Interesse.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Phospholipid Scramblase 1 wahrscheinlich an mehreren viralen Prozessen beteiligt ist, so dass die beobachtete Attenuierung der HSV-1 Replikation nach PLSCR1 *Silencing* auf kumulative Effekte zurückzuführen ist.

5. DISKUSSION

Ein essentieller Schritt in der HSV-1 Morphogenese ist die Auswanderung von neu gebildeten Capsiden aus dem Zellkern. Aufgrund ihrer Größe von etwa 125 nm Durchmesser sind reife Nukleocapside zu groß, um mit Hilfe des klassischen Kernexports über die Kernporenkomplexe in das Cytoplasma zu gelangen. Daher erfolgt die Auswanderung aus dem Zellkern bei allen Herpesviren durch einen noch kaum verstandenen Knospungsprozess an der INM. Die dadurch primär umhüllten Nukleocapside werden schließlich durch Fusion der primären Hülle mit der ONM oder ER-Membran vom perinukleären Raum ins Cytoplasma freigegeben. Für den Knospungsprozess an der INM sind die in allen Herpesviren konservierten Proteine UL34 und UL31 essentiell, welche zusammen den Kernauswanderungskomplex (NEC) an der INM bilden (Mettenleiter *et al.*, 2009). Im Fokus dieser Arbeit stand vor allem die funktionale Analyse der Zielsteuerung der beiden HSV-1 NEC-Proteine im viralen Kontext, welche durch die von U. Koszinowski und Mitarbeitern etablierte BAC Mutagenese ermöglicht wurde (Messerle *et al.*, 1997). Aufgrund neuer mechanistischer Erkenntnisse über den Kernauswanderungsprozess der Capside werden zukünftige therapeutische Alternativen erwartet, welche die Bekämpfung von viralen Stämmen mit Resistenzen gegen das allgemein angewendete Aciclovir ermöglichen.

5.1. Der essentielle *tail anchor* von UL34 – mögliche Funktionen beim *nuclear egress*

Das NEC-Protein UL34 ist ein Typ-II Transmembranprotein mit einer einzelnen kurzen TMD aus 20 Aminosäuren, welche nahe am C-Terminus liegt, einer großen cyto- bzw. nukleoplasmatisch orientierten N-terminalen Domäne und einer kurzen luminalen Region. Aufgrund dieser Domänenanordnung wird UL34 in die *tail anchor* Proteinfamilie eingeordnet (Shiba *et al.*, 2000; Bjerke *et al.*, 2003; Mettenleiter, 2004; Baines *et al.*, 2007; Mettenleiter *et al.*, 2009). Charakteristisch für TA-Proteine ist ihre post-translationale Biogenese, d.h. die Insertion in ihre Zielmembranen nach der vollständigen Beendigung der Translation. Dies konnte bereits für mehrere zelluläre TA-Proteine und kürzlich auch für das EBV Protein BNLF2a, einem herpesviralen Vertreter dieser Proteinfamilie, gezeigt werden (Stefanovic und Hegde, 2007; Favaloro *et al.*, 2008; Horst *et al.*, 2011). Mit Hilfe eines *in vitro* Membraninsertions-Assay konnte dies auch für UL34 bestätigt werden, da eindeutig gezeigt wurde, dass UL34 ausschließlich auf einem post-translationalen Weg in die Membran von rauen Mikrosomen inseriert wird, wobei eine stabile Membranassoziation ausschließlich über seine C-terminale hydrophobe Region vermittelt wird (Ott *et al.*, 2011). Dieser Befund stimmt mit einer vor kurzem durchgeführten Analyse von HSV-1 UL34 überein, bei welcher u.a.

gezeigt wurde, dass sich UL34 nach Deletion der gesamten hydrophoben Region im Inneren des Zellkerns ansammelt (Bjerke *et al.*, 2003).

Eine Besonderheit von TA-Proteinen ist, dass ihre post-translationale Insertion direkt in verschiedenste Membransysteme geschehen kann, wie z.B. die äußeren Membranen von Mitochondrien und Peroxisomen sowie die ER-Membranen. Interessanterweise wurde mit dieser genetischen Analyse von UL34 zum ersten Mal ein TA-Protein der INM näher untersucht. Die hier erzeugten Daten schließen somit die INM als eine weitere mögliche intrazelluläre Zielmembran für die direkte post-translationale Insertion eines TA-Proteins nicht aus, da es auch möglich wäre, dass UL34 nach der Synthese zuerst aktiv in den Zellkern transportiert und dort anschließend in die INM verankert wird.

Über die Frage, wie UL34 zur INM transportiert und in welchem Kompartiment der UL34/UL31-Komplex gebildet wird, ist bis jetzt jedoch noch wenig bekannt. Von zellulären TA-Proteinen weiß man, dass die Zielsteuerung zu den verschiedenen Membranen hauptsächlich von den physiko-chemischen Eigenschaften des *tail anchors* abhängt, welche die Länge und Hydrophobizität der TMD sowie flankierende positiv-geladene Sequenzbereiche einschließt (Horie *et al.*, 2002; Motz *et al.*, 2002; Kaufmann *et al.*, 2003; Borgese *et al.*, 2007). Der authentische *tail anchor* von UL34 konnte jedoch mit den entsprechenden Regionen der orthologen Proteine UL50 (HCMV) und BFRF1 (EBV) ohne Funktionsverlust ersetzt werden. Noch auffälliger war, dass eine funktionale Permutation auch mit den TA-Regionen von weiteren HSV-1 kodierten sowie zellulären TA-Proteinen unterschiedlichster Lokalisation und Funktion möglich war. Auch die flankierenden positiven Ladungen sowohl auf der nukleoplasmatischen als auch luminalen Seite des UL34 *tail anchors* werden für die Zielsteuerung sowie Funktion des Proteins nicht benötigt. Der TA-Insertionsmechanismus über α -helikale Strukturen scheint jedoch für die stabile Membranverankerung und somit Funktionsausübung des UL34 Proteins notwendig zu sein, da die TA-Permutation mit einem alternativen, nicht- α -helikalen INM-Verankerungsmechanismus nicht mehr toleriert wird. Im Gegensatz zu zellulären TA-Proteinen enthält der *tail anchor* von UL34 somit keine sequenzspezifischen Informationen oder hydrophobe Eigenschaften bezüglich der Zielsteuerung zur INM und Funktion. Stattdessen unterstützt die ausschließlich nukleäre Lokalisation einer UL34 TMD-Deletionsmutante sowie einer UL34 Mutanten mit stark verkürztem *tail anchor* in Abwesenheit von anderen viralen Faktoren eine intrinsische Kernimportaktivität innerhalb der N-terminalen Domäne (Bjerke *et al.*, 2003). Tatsächlich konnte in dieser Domäne eine klassische bipartite NLS Sequenz zwischen den Aminosäuren 177 und 195 identifiziert werden (siehe Abschnitt 5.2.1).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die früheren Daten der TMD-Deletionsmutante von HSV-1 UL34, welche im Inneren des Zellkern mislokalisierte und nicht mehr zu einer effizienten Virusreplikation in der Lage war, reproduziert (Bjerke *et al.*, 2003) und durch eine ins Detail

gehende funktionale Analyse des essentiellen *tail anchors* von UL34 mittels BAC Mutagenese erweitert. Die sukzessive Verkürzung der α -helikalen Domäne von UL34 auf 15 Aminosäuren resultiert in einer Wachstumskinetik, die dem HSV-1 Wildtyp vergleichbar ist. Das Entfernen von zwei weiteren Aminosäuren führte jedoch zu einem drastischen Phänotyp, da diese HSV-1 UL34 TA-Mutante nicht mehr imstande war, rekombinante Viren zu erzeugen. UL34 mit 15 Aminosäuren war außerdem stabil verankert und an der Kernperipherie zu finden, so dass die korrekte Zielsteuerung durch die Deletion der letzten 8 Aminosäuren des *tail anchors* nicht beeinflusst wurde, während noch kürzere UL34 TA-Versionen bereits im Kerninneren mislokalisiert vorlagen. Diese *in vivo* Experimente lassen somit eine bestehende Korrelation zwischen funktionaler Komplementation und korrekter Zielsteuerung von UL34 erkennen. Daher ist der Membrananker von UL34 insbesondere für die Verankerung des Proteins und demzufolge auch für die Lokalisierung des UL31/UL34-Komplexes an der INM während des *nuclear egress* essentiell. Eine ähnliche Beobachtung konnte auch bereits für ein weiteres TA-Protein gemacht werden. Emerin ist ein zellulärer Vertreter der TA-Proteinfamilie, welches seine Funktion wie UL34 an der INM ausübt. Aufgrund seiner genetischen Assoziation mit diversen Muskeldystrophien wie z.B. mit der X-chromosomal gekoppelten Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie (EDMD) gewann die Erforschung dieses Proteins in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung (Foisner, 2001; Wheeler und Ellis, 2008). Dabei wurde beobachtet, dass eine der Emerin Mutationen, welche in EDMD-Patienten gefunden wurde, eine Deletion von 6 Codons innerhalb der Transmembrandomäne beinhaltet. Aufgrund des verkürzten, nur noch 12 Aminosäuren langen *tail anchors* konnte das mutierte Emerin nicht mehr in die Kernmembran inseriert werden und wies folglich eine vorwiegend intranukleäre Lokalisation auf, bei welcher eine korrekte Funktion des Proteins nicht mehr ausgeübt werden konnte (Fairley *et al.*, 1999). Die Ergebnisse der hier durchgeführten genetischen Analyse der HSV-1 UL34 TMD-Deletionsmutanten stimmen somit gut mit dem Befund dieser Emerin Mutante überein. Beide Proteine tolerieren eine Deletion ihres TA von etwa 5 bis 6 Aminosäuren für eine stabile Membranverankerung sowie für die Zielsteuerung zur INM, ohne dabei in ihrer Funktion beeinträchtigt zu sein.

Seit längerem ist bereits bekannt, dass UL34 zusammen mit seinem Interaktionspartner UL31 für die Kernausswanderung der neu gebildeten Nukleocapside essentiell ist. Bis vor kurzem gab es aber noch keine Hinweise für welche Schritte genau die beiden Proteine benötigt werden und wie sie die jeweilige Funktion ausüben. Zwei neue Studien deuten jedoch darauf hin, dass der NEC eine relevante Rolle bei der Krümmung der inneren Kernmembran und der Vesikelformation während des Knospungsprozesses spielt (Klupp *et al.*, 2007; Roller *et al.*, 2010). Interessanterweise kann die Abwesenheit von UL31 unter bestimmten Umständen durch zelluläre Proteine kompensiert werden, so dass UL34

womöglich eine zentralere Aufgabe dabei übernimmt (Liang *et al.*, 2004). Prinzipiell sind Membrankrümmungen dynamische Prozesse, bei welchen die energetisch ungünstige Verbiegung durch die Ansammlung von *scaffolding* Proteinen und durch die Bildung von Lipid-Asymmetrien stabilisiert bzw. ermöglicht werden muss, wobei dies sowohl von der concaven als auch convexen Seite der Krümmung erfolgen kann (McMahon und Gallop, 2005; Graham und Kozlov, 2010; Lundmark und Carlsson, 2010). Um diesen Prozess zu unterstützen, könnte UL34 und insbesondere sein *tail anchor* verschiedene Funktionen übernehmen, welche in Abbildung 5.1 zu einem Modell zusammengefasst sind.

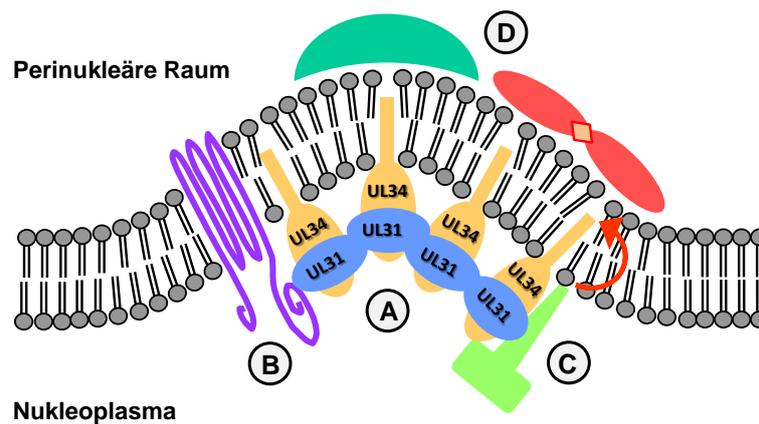


Abbildung 5.1: Modell über potentielle Membran-assoziierte Prozesse beim *nuclear egress*

A) NEC-Formation und -Multimerisierung induziert Membranknospung. UL34 ist dabei mit dem verkürzten, noch funktionalen *tail anchor* von 15 Aa. dargestellt. **B)** Rekrutierung von zellulären und/oder viralen Transmembranproteinen. **C)** Umverteilung der Lipide durch Insertion der α -helikalen TMD von UL34 und/oder Rekrutierung von Lipid-modifizierenden oder Lipid-transferierenden Proteinen. **D)** Stabilisierung durch luminale Proteine, welche gekrümmte Membranen sensorisch erkennen oder durch eine physikalische Interaktion mit dem UL34 TA rekrutiert werden. Letzteres ist jedoch für den *nuclear egress* nicht vonnöten.

Wie bereits erwähnt, wird in Folge der NEC-Bildung an der INM eine negative Krümmung der Membran induziert, womit der Knospungsprozess eingeleitet wird. Dafür ist eine stabile Insertion von UL34 in die INM über seinen *tail anchor* zwingend erforderlich. In dem von R. Roller und Mitarbeitern vorgeschlagenen Modell wird vermutet, dass durch eine Konformationsänderung des NEC eine Homo- bzw. Heterooligomerisierung von UL34 und UL31 auf der nukleoplasmatischen Seite induziert wird, wobei die Geometrie dieser multimeren Interaktionen, welche vergleichbar zu BAR-Domänen ist, schließlich die Krümmung der INM um die Capside antreibt (Roller *et al.*, 2010). BAR-Domänen besitzen eine Bananen-ähnliche Form und binden bevorzugt an entsprechend gekrümmte Lipidmembranen, wodurch eine Stabilisierung der energetisch ungünstigen Verformung erreicht wird (Abb. 5.1 A) (Suetsugu *et al.*, 2010). Eine zusätzliche Stabilisierung der induzierten Membrankrümmung durch angedockte Capside wird allerdings nicht benötigt, da Vesikel, welche in Größe und Topologie umhüllten Virionen gleichen, unabhängig vom Capsid und auch von weiteren viralen Faktoren gebildet werden können (Klupp *et al.*, 2007). Jedoch

könnten andere virale Proteine, wie etwa die Glykoproteine gM und gD, welche von mehreren Gruppen bereits an der INM gefunden wurden, durch Interaktion mit UL34 den energetisch ungünstigen Knospungsprozess unterstützen (Abb. 5.1 B) (Baines, 2007; Baines *et al.*, 2007; Wills *et al.*, 2009). Eine weitere wichtige Voraussetzung für die Krümmung einer Membran ist eine Umstrukturierung ihrer Lipide, so dass es zu einer Auflösung der Lipid-Asymmetrie zwischen den zwei *leaflets* kommt. Generell gilt, dass Phospholipide (PL) mit einer kegelförmigen Struktur Membrankrümmungen begünstigen, während PL mit einer zylinderförmigen Form dieser entgegenwirken. Die Veränderung ihrer Verteilung innerhalb einer Membran kann deren Knospungseigenschaft somit entscheidend beeinflussen (Chan *et al.*, 2010). Es wäre daher auch denkbar, dass UL34 dafür Proteine rekrutiert wie z.B. Phospholipid Flippasen oder Scramblasen, welche entweder eine Umverteilung der Lipide zwischen den beiden *leaflets* der INM ermöglichen oder auch die Kopfgruppen der Lipide enzymatisch verändern. In der Tat konnte eine spezifische Wechselwirkung zwischen UL34 und der Phospholipid Scramblase 1 (PLSCR1) gezeigt werden (siehe Abschnitt 5.3.2). Zusätzlich könnte UL34 durch die Insertion seiner α -helikalen TMD eine lokale Störung der Lipidordnung hervorrufen, wodurch ein Austausch erleichtert wird (Sanyal und Menon, 2009). Die minimale noch funktionale Länge des *tail anchors* von UL34 konnte im Rahmen dieser Arbeit auf 15 Aminosäuren eingegrenzt werden. Dies reicht aus, um dreiviertel der INM zu durchspannen, d.h. der *tail anchor* würde noch in das luminal exponierte *leaflet* der INM hineinragen und könnte somit auch den Lipidtransfer zur convexen Seite der Membranknospung beeinflussen (Abb. 5.1 C). Ebenso könnten luminale ER-Proteine den Knospungsprozess von der convexen Seite der gekrümmten Membran energetisch begünstigen (Abb. 5.1 D). Da aber die Virusreplikation unabhängig von den letzten 8 Aminosäuren des UL34 Proteins abläuft, ist eine physikalische Interaktion mit dem UL34 *tail anchor* unwahrscheinlich. Auch für den anschließenden Fusionsprozess scheint UL34 primär nicht benötigt zu werden, da der verkürzte TA nicht bis in das Lumen reicht. Die Beobachtung, dass sich im Pseudorabies-Virus bei alleiniger transients Expression der NEC-Proteine die induzierten Knospungsvesikel im perinukleären Raum ansammeln, eine Fusion mit der ONM jedoch unterbleibt, spricht für die Beteiligung und Bedeutung von zellulären Faktoren (Klupp *et al.*, 2007). Wie es tatsächlich zur Fusion der primär umhüllten Capside mit der äußeren Kernmembran kommt, ist derzeit unklar. Die NEC-Proteine könnten jedoch den Kontakt zur ONM-Ziellmembran herstellen und ein weiteres, unbekanntes Protein mit einer zur Vesikelaußenseite-exponierten fusogenen Domäne rekrutieren, welches den Fusionsprozess einleitet.

5.2. Bedeutung des klassischen Kernimports für die Zielsteuerung der HSV-1 NEC-Proteine

Die funktionale Charakterisierung des UL34 *tail anchors* im viralen Kontext hat gezeigt, dass dieser, im Gegensatz zu mehreren zellulären TA-Proteinen, vermutlich keine sequenz-spezifische Information für die subzelluläre Zielsteuerung von UL34 zur INM enthält. Mittels bioinformatischer Methoden konnte jedoch ein klassisches Kernlokalisierungssignal (NLS) innerhalb der N-terminalen Domäne von HSV-1 UL34 und auch von HSV-1 UL31 vorhergesagt werden, was für einen aktiven Rezeptor-vermittelten Import dieser Proteine in den Zellkern sprechen würde. NLS Sequenzen wurden auch schon für HSV-2 UL31 und sein orthologes Protein in MCMV beschrieben (Zhu *et al.*, 1999; Lotzerich *et al.*, 2006). Um nun im Rahmen dieser Arbeit herauszufinden, ob die identifizierten NLS Sequenzen der HSV-1 NEC-Proteine für deren Kerntransport essentiell sind, wurden jeweils gezielte NLS Mutationen eingeführt und mittels BAC Mutagenese im viralen Kontext untersucht.

5.2.1. Die UL34 NLS ist im viralen Kontext nicht essentiell

In Kooperation wurde im Vorfeld gezeigt, dass das HSV-1 UL34 Protein in Abwesenheit von anderen viralen Proteinen eine funktionale klassische bipartite NLS zwischen As. 177 und 195 besitzt. Diese wird für die spezifische Bindung an mehrere Rezeptoren der Importin α -Familie benötigt, da ein gezielter Austausch von drei basischen mit neutralen Aminosäuren im zweiten Cluster der bipartiten NLS Sequenz zu einer UL34 NLS Mutante führte, welche nicht mehr in der Lage war, mit den Transportrezeptoren zu interagieren. Ebenso konnte durch den Transfer dieser NLS Sequenz auf ein inertes, cytoplasmatisches Protein eindeutig eine Translokation des Fusionsproteins in den Zellkern demonstriert werden. Somit scheint die UL34 NLS Sequenz in Abwesenheit anderer viraler Proteine eine funktionale Kernimport-Aktivität zu besitzen (Raschbichler, 2011). Nach BAC Mutagenese der beschriebenen NLS Sequenz und Rekonstitution der UL34 NLS Virusmutante wies trotz mutierter NLS sowohl die UL34 Mutante als auch dessen UL31 wt Interaktionspartner eine Lamin A/C-ähnliche Lokalisation an der Kernperipherie auf. Somit hatte die UL34 NLS Mutagenese weder Auswirkung auf die Zielsteuerung der NEC-Proteine zur INM noch auf die Bildung eines funktionalen NEC. Das UL34 Protein könnte die INM durch einen redundanten Mechanismus erreichen, etwa durch eine zweite eigene NLS oder ein interagierendes NLS-tragendes Protein. Falls sich der UL34/UL31-Komplex bereits im Cytoplasma bildet, wäre es daher auch denkbar, dass der Kernimport gemeinsam über die NLS von UL31 erfolgt. Aufgrund der erzielten Ergebnisse mit der HSV-1 Doppelmutante, in welcher die NLS Sequenz beider NEC-Proteine mutiert war, besteht die Möglichkeit, dass UL34 und UL31 abhängig voneinander in den Zellkern transportiert werden (siehe Abschnitt 4.1.3). Ein weiteres Indiz für die Redundanz der UL34 NLS Sequenz liefert die Beobachtung, dass sich eine transient

exprimierte UL34 TMD-Deletionsmutante sowohl mit wt als auch mit mutierter NLS im Kern befindet (Raschbichler, 2011). Da UL34 mit einer Größe von 30 kDa im Grenzbereich liegt, bei welcher eine passive Diffusion durch den Kernporenkomplex noch möglich ist, könnte es auch allein auf diesem Weg in den Zellkern gelangen, wo es schließlich durch direkte oder indirekte Interaktion mit der Kernlamina und/oder UL31 an der INM akkumuliert. Die UL34 NLS Mutagenese führte jedoch im Viruskontext zu einer leichten Attenuierung im herpesviralen Replikationsverlauf. Die identifizierte NLS von UL34 scheint also für den Kernimport des Proteins nicht zwingend notwendig zu sein, übt aber einen Einfluss auf dessen Transportdynamik aus. Ob die NLS Sequenz tatsächlich den Transport von UL34 in den Zellkern unterstützt und damit einen schnellen Import erleichtert, ist für zukünftige kinetische Analysen von großem Interesse.

5.2.2. Die UL31 NLS ist eine für die Virusreplikation essentielle Sequenz

Für das HSV-1 NEC-Protein UL31 wird innerhalb der N-terminalen variablen Domäne eine klassische bipartite NLS zwischen den Aminosäuren 21 und 42 vorhergesagt. Diese besteht aus zwei Clustern von basischen Arginin- oder Lysinresten und ist konserviert auch in anderen herpesviralen Orthologen zu finden (Zhu *et al.*, 1999; Lotzerich *et al.*, 2006). Die identifizierte NLS Sequenz von HSV-1 UL31 erfüllt in Abwesenheit von anderen viralen Faktoren alle wichtigen Kriterien einer funktionalen NLS. So wird sie für die spezifische und NLS-abhängige Bindung an mehrere Rezeptoren der Importin α -Familie benötigt, ist transferierbar, notwendig für die nukleäre Lokalisation von UL31 bei transienter Expression und kann durch eine alternative NLS kompensiert werden (Raschbichler, 2011). Im viralen Kontext erzielte die UL31 NLS Mutagenese einen letalen Phänotyp. Die Revertante derselben zeigte eine HSV-1 wt-ähnliche Virusvermehrung sowie *Plaquebildung*. Damit konnte ausgeschlossen werden, dass der beobachtete Phänotyp der UL31 NLS Mutante auf weitere unerwünschte Rekombinationsereignisse im HSV-1 Genom zurückzuführen ist. Desweiteren konnte mittels indirekter Immunfluoreszenz gezeigt werden, dass die UL31 NLS Mutagenese keine Auswirkungen auf die Expression und subzelluläre Lokalisation des essentiellen UL32 Proteins hat, dessen kodierende Sequenz am 3' Ende mit den ersten acht Basenpaare von UL31 überlappt. Aufgrund dieser Ergebnisse liegt die Vermutung nahe, dass die NLS Sequenz von UL31 auch im Viruskontext essentiell ist, da der letale Phänotyp der HSV-1 UL31 NLS Mutante eindeutig auf die eingeführte NLS Mutation zurückzuführen war. Dies stimmt gut mit der Tatsache überein, dass auch eine N-terminale Deletionsmutante des UL31-orthologen M53 Proteins aus MCMV, in welcher die NLS Sequenz fehlt, nicht mehr in der Lage war, Virus-Nachkommen zu produzieren (Lotzerich *et al.*, 2006). In Abwesenheit von anderen viralen Faktoren konnte der Kernimport der UL31 NLS Mutante durch die N-terminale Fusion einer SV40 NLS Sequenz funktional wiederhergestellt werden.

Allerdings ist es im viralen System nicht gelungen, den letalen Phänotyp der HSV-1 UL31 NLS Mutante dadurch zu reparieren. Da im HSV-1 (17⁺)lox der N-Terminus der UL31 kodierenden Sequenz einen 8 bp langen überlappenden Sequenzbereich mit dem C-Terminus der UL32 kodierenden Sequenz besitzt, musste für die Insertion einer UL31 NLS Mutante mit einer N-terminal fusionierten SV40 NLS diese Überlappungssequenz dupliziert werden. Zusätzlich wurde das authentische UL31 Startcodon durch eine Punktmutation still gelegt, ohne die kodierende Sequenz von UL32 am 3' Ende zu verändern. Auch hier konnte eine funktionale Revertante generiert werden, welche immer noch den duplizierten Sequenzbereich sowie die eingeführte Punktmutation am originalen UL31 Startcodon enthielt, so dass eine Veränderung außerhalb des mutierten Bereiches ausgeschlossen werden kann. Möglicherweise wirkt sich die Insertion der 8 Aminosäuren langen SV40 NLS innerhalb des 3' untranslatierten Bereiches von UL32 negativ auf die Regulation der UL32 Expression aus. Da das UL32 Genprodukt ein für die HSV-1 Replikation essentielles DNA *cleavage/packaging* Protein ist (Lamberti und Weller, 1998), könnte die HSV-1 SV40 NLS-UL31 NLS Mutante außer der NLS Mutation einen zweiten, völlig unabhängigen Defekt im UL32 Gen tragen. Eine eindeutige funktionale Aussage kann deshalb zu diesem Zeitpunkt nicht getroffen werden. Die durchgeführten Y2H-Interaktionsstudien zeigten aber, dass nur das zweite Cluster der bipartiten UL31 NLS Sequenz für die Bindung an Importin α -Rezeptoren benötigt wird. Als Alternative zur N-terminalen Fusion der SV40 NLS könnte in Zukunft versucht werden, eine heterologe NLS anstelle des ersten NLS Clusters zu inserieren, wodurch die kodierende Sequenz sowie der 3' untranslatierte Bereich von UL32 nicht unmittelbar betroffen wäre. Auch für das orthologe Protein M53 aus MCMV gelang es durch die Insertion einer SV40 NLS Sequenz 16 Aminosäuren nach dem M53 Startcodon die Funktionalität zu rekonstruieren (Lotzerich *et al.*, 2006).

Um eine Analyse unter Infektionsbedingungen zu ermöglichen, ist eine erfolgreiche Virus-Rekonstitution des UL31 NLSmt BAC unbedingt vonnöten. Trotz mehrerer Versuche in verschiedenen Zelllinien konnte die UL31 NLS Mutante jedoch nicht durch ein Wildtyp UL31 *in trans* komplementiert werden. Interessanterweise gelang dies auch in RSC Zellen nicht, welche komplementierendes Wildtyp UL31 konstitutiv exprimierten, während die Virusvermehrung einer UL31-Deletionsmutante dadurch ermöglicht werden konnte (Liang *et al.*, 2004). Demnach könnte es sich bei der UL31 NLS Mutante um eine dominant-negative (DN) Mutante handeln, d.h. die UL31 NLS Mutante wäre in der Lage, ein vorhandenes UL31 wt funktional zu unterdrücken. Um diese Hypothese zu bestätigen, könnte man die kodierende Sequenz der UL31 NLS Mutante auch an eine ektopische Stelle im HSV-1(17⁺)lox BAC einsetzen. Eine geeignete Stelle, welche die Insertion eines zusätzlichen Gens ohne Beeinträchtigung der restlichen HSV-1 Genprodukte tolerieren würde, ist jedoch bisher nicht bekannt. Da aufgrund dessen keine rekombinanten Viren erzeugt werden konnten, basierten

alle durchgeführten Immunfluoreszenz-Experimente auf Transfektion der generierten BAC DNA. Die Analyse der subzellulären Verteilung von UL31 und auch UL34 zeigte dabei eindeutig, dass durch die UL31 NLS Mutagenese weder UL31 noch sein Partnerprotein UL34 am Kernimport gehindert waren. Alle HSV-1 UL31 NLS Mutanten sowie entsprechende Revertanten wiesen eine dem Wildtyp vergleichbare Lokalisation von UL31 im Kern und an der Kernhülle auf, sowie eine korrekte Lokalisation von UL34 an der Kernperipherie. Da in Abwesenheit von anderen viralen Proteinen die UL31 NLS Sequenz für den Transport des Proteins in den Zellkern essentiell ist, ist es sehr wahrscheinlich, dass im viralen Kontext andere Virusproteine oder viral modifizierte Wirtsproteine den Funktionsverlust der NLS Sequenz kompensieren. Im Gegensatz dazu wurde die subzelluläre Verteilung der NLS Deletionsmutanten der HSV-1 UL31 orthologen Proteine MCMV M53 und HSV-2 UL31 nur nach transients Expression in Abwesenheit von anderen viralen Faktoren gezeigt, wobei auch hier eine Mislokalisierung im Cytoplasma aufgrund der fehlenden NLS beobachtet wurde. Eine Aussage über die Funktion der NLS Sequenz während der herpesviralen Replikation kann dabei jedoch nicht getroffen werden (Zhu *et al.*, 1999; Lotzerich *et al.*, 2006).

Mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen kann der letale Phänotyp der UL31 NLS Mutanten nicht mit einer Beeinträchtigung der NEC-Bildung begründet werden. Deswegen liegt die Vermutung nahe, dass die NLS Sequenz von UL31 eine für die Virusreplikation essentielle Funktion ermöglicht, welche unabhängig vom NEC möglicherweise zu einem anderen Zeitpunkt während der Infektion von Bedeutung ist. Ursprünglich ging man davon aus, dass UL31 spät in der Infektion als ein *late* Protein synthetisiert wird (Holland *et al.*, 1984). Neuere Arbeiten zeigen jedoch, dass geringe Mengen von HSV-1 UL31 bereits in der frühen Phase der Infektion exprimiert werden und für eine optimale NFκB-Aktivierung sowie virale Genexpression benötigt werden (Roberts und Baines, 2011). Während einige Viren den NFκB-Signalweg blockieren, ist dessen Aktivierung hingegen für die effiziente HSV-1 Replikation eine wichtige Voraussetzung (Patel *et al.*, 1998). Diese frühe essentielle UL31 Funktion liefert eine denkbare Erklärung für den in dieser Arbeit beobachteten letalen Phänotyp der UL31 NLS Mutante. Möglicherweise kann die UL31 NLS Mutante in der frühen Phase der Virusreplikation, in der wenige potentiell kompensierende Virusproteine coexprimiert werden, nicht in den Zellkern gelangen, wo es aber für die NFκB-Aktivierung und/oder sonstige frühe essentielle Funktionen benötigt wird. Zu einem späteren Zeitpunkt könnte etwa der NEC-Partner UL34 kompensierend wirken, wie auch Ergebnisse der HSV-1 Doppelmutante, in welcher die NLS Sequenzen beider NEC-Proteine mutiert wurden, nicht ausschließen (siehe Abschnitt 4.1.3).

Alternativ wäre es auch denkbar, dass die NLS Sequenz von UL31 eine wichtige Bindestelle für ein bis jetzt noch unbekanntes virales oder zelluläres Protein beinhaltet, die durch die

Fusion einer SV40 NLS natürlich nicht wiederhergestellt werden kann. Die kürzlich identifizierten Phosphorylierungsstellen der viralen Proteinkinase US3, die zum Teil innerhalb der mutierten NLS Sequenz von UL31 liegen, können jedoch nicht für den drastischen Phänotyp der UL31 NLS Mutante verantwortlich sein, da sie *per se* nicht essentiell sind (Mou *et al.*, 2009). Hingegen könnten wichtige virale Prozesse gestört werden, wie z.B. die bereits beschriebene Aktivierung des NF κ B-Signalwegs oder der *DNA packaging* Prozess während der Capsidreifung, für welchen bereits eine Beteiligung für zwei UL31-orthologe Proteine gezeigt werden konnte und auch für HSV-1 vermutet wird (Chang *et al.*, 1997; Granato *et al.*, 2008; Popa *et al.*, 2010). Die UL31 NLS Mutante war jedoch in der Lage Replikationszentren zu bilden, d.h. die UL31 NLS Mutagenese scheint prinzipiell keinen Einfluss auf die virale Replikation zu haben, während sich eine UL31 Deletion negativ darauf auswirkte (Chang *et al.*, 1997). Desweiteren war die Capsidmorphogenese der HSV-1 UL31 NLS Mutante nicht beeinträchtigt, wie Immunofluoreszenz Analysen mit Hilfe eines VP5-spezifischen Antikörpers, welcher ausschließlich Hauptcapsidproteine in reifen Capsiden detektiert, zeigten. Schließlich könnten die eingeführten Mutationen auch unerwünschte strukturelle Veränderungen im UL31 Protein herbeigeführt haben und etwa eine potentielle homotypische Interaktion von UL31 stören, welche kürzlich für das orthologe Protein M53 in MCMV berichtet wurde (Lötzerich, 2007; Pogoda *et al.*, 2011). Eine Inhibierung dieser womöglich wichtigen UL31 Oligomerisierung wäre auch ein weiteres Indiz dafür, dass es sich hierbei um eine DN-Mutante handelt. Die Wechselwirkung mit UL34 war allerdings durch die UL31 NLS Mutagenese nicht beeinträchtigt (Raschbichler, 2011).

5.2.3. Die simultane NLS Mutagenese führt zu beeinträchtigtem Kernimport der NEC-Proteine

Eine einzelne NLS Mutagenese entweder im UL34 oder im UL31 Protein hatte im viralen Kontext keine Auswirkung auf die nukleäre Lokalisation dieser beiden Proteine, so dass auch die NEC-Bildung unbeeinflusst war. Im Gegensatz dazu konnte bei der HSV-1 Doppelmutante, in welcher die NLS Sequenz sowohl von UL34 als auch UL31 mutiert war, eine deutliche Mislokalisierung der NEC-Proteine beobachtet werden. Beide Proteine waren hauptsächlich im Cytoplasma, zum Teil in ungleichmäßigen punktierten Foci, zu finden. Die simultane NLS Mutagenese scheint somit den Kernimport der NEC-Proteine erheblich zu beeinträchtigen. Dies könnte auf eine direkte oder auch indirekte Abhängigkeit zwischen UL34 und UL31 bezüglich ihres Transports in den Zellkern hindeuten. Möglicherweise kann aufgrund eines Coimports der Verlust einer funktionalen NLS durch das noch vorhandene im Partnerprotein kompensiert werden. Da im Gegensatz zu UL31 die NLS Sequenz von UL34 mitten im Protein liegt, könnten die dort eingeführten Mutationen auch zu einer vorzeitigen Konformationsänderung von UL34 im Cytoplasma führen, welche normalerweise erst an der INM erfolgen würde (Roller *et al.*, 2010). Als Folge dessen könnte sich der NEC bereits im

Cytoplasma bilden. Obwohl die NLS von UL31 im viralen Kontext für den Kernimport des Proteins spät in der Infektion nicht nötig ist, würde UL31 unter diesen Umständen von UL34 im Cytoplasma zurückgehalten bzw. der Kernimport des frühzeitig gebildeten UL34/UL31-Komplexes verhindert werden. Ob UL34 und UL31 bereits im Cytoplasma interagieren oder letztendlich erst an der INM, konnte mangels geeigneter Reagenzien nicht festgestellt werden, ist jedoch aufgrund der ähnlichen Immunofluoreszenz-Muster von UL31 und UL34 wahrscheinlich.

Aufgrund der letalen UL31 NLS Mutation war die NLS Doppelmutante, wie zu erwarten, nicht lebensfähig. Somit lässt sich in diesem Fall nur schwer sagen, ob der beeinträchtigte Kerntransport der NEC-Proteine zusätzlich zum letalen Phänotyp beigetragen hat oder ob sich dieser allein mit der noch unbekanntes essentiellen Funktion der UL31 NLS Sequenz erklären lässt. Um diese Frage beantworten zu können, müssten auch hier TEM-Analysen herangezogen werden, wofür jedoch entsprechende rekombinante Viren unabdingbar wären.

5.3. Einfluss von Wirtsfaktoren auf die herpesvirale Replikation

Für eine erfolgreiche Virusvermehrung ist das Herpes-simplex-Virus 1 wie auch alle anderen Viren von seinem Wirt abhängig, so dass neben den zahlreichen intraviralen Protein-Protein-Interaktionen auch die Wechselwirkungen zwischen viralen und zellulären Proteinen von großer Bedeutung sind. Da das HSV-1 Genom im Gegensatz zu kleinen RNA-Viren wie HIV und Influenza für viele Proteine kodiert, könnten gleich mehrere zelluläre Prozesse direkt beeinflusst werden. Die Charakterisierung dieses komplexen Zusammenspiels von Virus und Wirt ist daher Voraussetzung für ein mechanistisches Verständnis des herpesviralen Lebenszyklus.

Da im Fokus dieser Arbeit insbesondere die Zielsteuerung des HSV-1 TA-Proteins UL34 steht, sollte nicht nur sein viraler Interaktionspartner UL31, sondern auch zwei interagierende Wirtsproteine in die funktionale Analyse miteinbezogen werden. Aufgrund neuer Einsichten in die Biogenese von TA-Proteinen stellte das Wirtsprotein Asna1, ein für zelluläre TA-Proteine identifizierter Faktor der Zielsteuerung und Membraninsertion, einen sehr interessanten zellulären Kandidaten dar. Eine Interaktion von Asna1 mit HSV-1 UL34 sowie mit UL56 und US9, zwei weiteren HSV-1 kodierten TA-Proteinen, konnte mittels Y2H gezeigt werden. Bei dem zweiten Wirtsprotein, welches im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht wurde, handelte es sich um die Phospholipid Scramblase 1 (PLSCR1), welche in einem genomweiten Y2H *screen* u.a. als Interaktor von HSV-1 UL34 gefunden wurde. Ebenso konnte bereits durch eine genomweite Analyse basierend auf RNA Interferenz eine Beeinflussung der herpesviralen Replikation durch diesen zellulären Faktor gezeigt werden. Die funktionale Bedeutung dieser beiden Wirtsproteine für die HSV-1 Replikation wurde

basierend auf RNA Interferenz untersucht. Mit Hilfe dieses Systems konnten bereits verschiedenste zelluläre Proteine und Prozesse, die für den herpesviralen Infektionsverlauf von Bedeutung sind, identifiziert und charakterisiert werden (Muylaert und Elias, 2007; Schmidt *et al.*, 2010; Bryant *et al.*, 2011; Cepeda und Fraile-Ramos, 2011). Um jedoch das siRNA-System ohne Bedenken anwenden zu können, muss eine erfolgreiche Suppression der Proteinexpression durch die spezifische siRNA gewährleistet werden. Sowohl für Asna1 als auch für PLSCR1 gelang es, die Expression des Proteins in Hela Zellen nahezu vollständig und homogen zu unterdrücken, ohne dass diese in ihrer Lebensfähigkeit merklich beeinträchtigt wurden. Die siRNA Behandlung hatte demnach keine grundlegende zelluläre Auswirkung auf die Hela Zellen, so dass deren Auswirkung nach Depletion der Wirtsproteine auf verschiedene herpesvirale Prozesse untersucht werden konnte.

5.3.1. Der potentielle TA-Insertionsfaktor Asna1 greift spät in den HSV-1 Replikationszyklus ein

Die post-translationale Biogenese der *tail anchor* Proteine wird normalerweise von zellulären Chaperonen, *Targetingfaktoren* sowie von Membranrezeptoren unterstützt. Vor Kurzem wurde ein neuer Chaperon-vermittelter *Pathway* für die ER-Insertion von TA-Proteinen entdeckt, der vermutlich den wichtigsten TA-Insertionsweg darstellt. In diesem spielt u.a. der potentielle Insertionsfaktor Asna1 (TRC40) eine zentrale Rolle, indem er neu synthetisierte TA-Proteine über ihre TMD bindet und zu dem spezifischen ER-Rezeptor WRB führt, eine weitere identifizierte Komponente des *transmembrane domain recognition complex* (TRC), wo anschließend die Insertion stattfindet (Stefanovic und Hegde, 2007; Rabu *et al.*, 2009; Borgese und Fasana, 2011; Vilardi *et al.*, 2011). Für viele Modell-TA-Proteine wie z.B. Sec61 β , eine Untereinheit des Sec61 Translokationskomplexes, das Ribosomen-assoziierte Membranprotein 4 (RAMP4) und einige SNARE Proteine, welche an vesikulären Transport- und Fusionsprozessen beteiligt sind, konnte bereits gezeigt werden, dass diese bevorzugt den Asna1-vermittelten Insertionsweg in die ER-Membran nutzen (Favaloro *et al.*, 2008; Rabu *et al.*, 2009). Ebenso wird aber eine Asna1-unabhängige Insertion für einige zelluläre TA-Proteine berichtet, wie z.B. das Cytochrom b5, den apoptotischen Faktor Bcl-XL und das SNARE Protein Vamp2 (Abell *et al.*, 2004; Setoguchi *et al.*, 2006; Favaloro *et al.*, 2008; Colombo *et al.*, 2009; Rabu *et al.*, 2009).

Alle bisher gewonnenen Erkenntnisse über die Asna1-vermittelte TA-Biogenese basieren jedoch lediglich auf *in vitro* Daten, die nicht unbedingt der tatsächlichen physiologischen Situation entsprechen müssen. Mit dieser Arbeit wurde nun der Einfluss von Asna1 *in vivo* untersucht. Eine Voraussetzung für die Erkennung durch Asna1 ist vermutlich eine stark hydrophobe TMD mit einem Hydrophobizitätsindex ≥ 40 (Rabu *et al.*, 2008). Tatsächlich deutet der TMD-Hydrophobizitätsindex der HSV-1 kodierten TA-Proteine UL34, UL56 und US9, welcher jeweils über 40 liegt, auf einen Asna1-vermittelten Insertionsweg hin. Im

Rahmen dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass Asna1 zwar mit allen drei TA-Proteinen von HSV-1 spezifisch interagiert, jedoch vermutlich nicht für deren Zielsteuerung und Membraninsertion benötigt wird. Nach >99%-iger Depletion des Wirtsproteins Asna1 konnte in Abwesenheit einer Infektion UL34 an ER-Membranen sowie an der Kernperipherie beobachtet werden, während die Proteine UL56 und US9 erwartungsgemäß am Golgi lokalisierten. Mit der hier angewendeten Analyse der subzellulären Lokalisation mittels indirekter Immunfluoreszenz kann aber keine quantitative Aussage getroffen werden. Somit wäre es trotzdem denkbar, dass die Depletion von Asna1 zu einer langsameren bzw. weniger stabilen Membranintegration der TA-Proteine führte. Eine weitere Möglichkeit, die Insertion in die ER-Membran zu überprüfen, basiert auf der Tatsache, dass Proteine mit luminalen Erkennungssequenzen im ER durch N-Glykosylierungen post-translational modifiziert werden. Das Vorhandensein von kovalent gebundenen N-Glykanen liefert somit einen eindeutigen Beweis für eine effiziente Membraninsertion. Dies könnte man sich durch das Anhängen eines Opsin-tags, in welchem N-Glykosylierungsmotive enthalten sind, an den C-Terminus der HSV-1 TA-Proteine zunutze machen. Nur bei einer erfolgreichen Insertion in die ER-Membran könnte eine N-Glykosylierung des luminalen Opsin-tags nachgewiesen werden. Für mehrere zelluläre TA-Proteine, wie auch für das EBV TA-Protein BNLF2a wurde diese beschriebene Methode bereits angewendet (Rabu *et al.*, 2008; Claessen *et al.*, 2010; Horst *et al.*, 2011).

Die bis jetzt erzielten *in vivo* Daten weisen somit darauf hin, dass das Wirtsprotein Asna1 keinen Einfluss auf die Zielsteuerung sowie Membraninsertion der drei HSV-1 Proteine hat. Ebenso konnte kürzlich durch zwei weitere herpesvirale Studien *in vivo* gezeigt werden, dass bei Coexpression einer Asna1 DN-Mutante die Membraninsertion sowie Funktion der TA-Proteine BNLF2a von EBV und U24 der humanen Herpesviren 6/7 nur teilweise beeinträchtigt war (Sullivan und Coscoy, 2010; Horst *et al.*, 2011). In dieser Arbeit sowie den oben genannten Studien zeigte sich auch, dass Asna1 für die Zelle grundsätzlich nicht essentiell ist. Angesichts der vielfältigen und wichtigen zellulären Funktionen von TA-Proteinen wäre es daher naheliegend, dass *in vivo* mehrere redundante Mechanismen dafür vorhanden sind. Seit längerem wird vermutet, dass für die post-translationale TA-Biogenese neben dem Asna1 *Pathway* auch noch weitere alternative Chaperon-vermittelte Insertionswege existieren müssen, etwa mittels SRP oder des Hitzeschockprotein-Dimers Hsc70/Hsp40 (Abell *et al.*, 2004; Rabu *et al.*, 2008; Colombo *et al.*, 2009). Auch für die hier untersuchten herpesviralen TA-Proteine könnte dies zutreffen, so dass sie das Fehlen des Asna1 Proteins kompensieren könnten.

In Abwesenheit des Asna1 Proteins konnte eine deutliche Beeinträchtigung der herpesviralen Replikation gezeigt werden. Obwohl dieses Wirtsprotein also *per se* nicht essentiell ist, scheint es für die Virusmorphogenese wichtig zu sein. Durch eine detaillierte Analyse

konnte eine Beteiligung an den frühen Replikationsschritten wie dem Eintritt der Herpesviren in die Wirtszelle, der nukleären Morphogenese sowie der Bildung von reifen, infektiösen Viruspartikeln ausgeschlossen werden. Die Daten weisen jedoch eindeutig auf eine Rolle von Asna1 während der finalen Auswanderung aus der Zelle hin. Falls die HSV-1 TA-Proteine durch die Depletion von Asna1 tatsächlich eine wenn auch nur leichte Stabilitätsveränderung ihrer Membranverankerung aufweisen, könnte sich dies auch kumulativ negativ auf deren Funktion auswirken. Im Fall des NEC-Proteins UL34 wäre dabei der *nuclear egress* der neu gebildeten Capside beeinträchtigt, was aufgrund seiner erwarteten Funktion in eine reduzierte Freisetzung von Virionen aus dem Zellkern münden sollte. Dies ist jedoch nicht zu beobachten. Eine Störung des UL56 bzw. US9 Proteins, welche vermutlich an vesikulären Transportprozessen beteiligt sind, könnte einen Effekt auf die sekundäre Umhüllung der Viruspartikel an modifizierten Membranen des TGN haben. Letztere könnten also die Auswanderung der Virionen aus der Wirtszelle mit beeinflussen.

Durch die Depletion des Asna1 Proteins könnten auch zelluläre Prozesse betroffen sein, welche für die Freisetzung der reifen Viruspartikel von Bedeutung sind. Zum einen könnte die Biogenese zellulärer TA-Proteine, welche womöglich wichtige Funktionen bei einem der späten HSV-1 Replikationsschritte übernehmen, unzureichend sein. Insbesondere könnten in Asna1 depletierten Zellen während der HSV-1 Infektion bestimmte TA-Proteine aufgrund der enormen Virusproduktion bzw. der sekretorische *Pathway* aufgrund der erhöhten Sekretionslast limitierend werden, wodurch der finale Fusionsprozess inhibiert und somit die effiziente Freisetzung der reifen HSV-1 Virionen nicht mehr gewährleistet wird. Eine funktional wichtige Gruppe innerhalb der TA-Proteine stellen die SNARE Proteine dar, welche vesikuläre Transport- und Membranfusionsprozesse innerhalb eukaryotischer Zellen sowie die Exozytose von sekretorischen Vesikeln vermitteln (Salaun *et al.*, 2004; Jahn und Scheller, 2006). Diese SNARE Proteine könnten auch eine Schlüsselrolle bei der sekundären Umhüllung der Viruspartikel an intrazellulären TGN-Vesikelmembranen, beim Vesikeltransport zur Plasmamembran und bei der exozytotischen Freisetzung der Virionen spielen. Ebenso ist ein SNARE-abhängiger Transport von viralen Proteinen und/oder zellulären Komponenten zur Assemblierungsstelle im Cytoplasma denkbar. Es ist also nicht unwahrscheinlich, dass diese zelluläre Transport- und Fusionsmaschinerie vom Herpesvirus genutzt wird, um eine optimale Produktion und Freisetzung von neuen Virionen zu gewährleisten. In einer erst kürzlich veröffentlichten Studie konnte bereits eine funktionale Rolle des SNARE TA-Proteins Syntaxin 3 für die Virusmorphogenese in HCMV gezeigt werden, da die Depletion von Syntaxin 3 zu einer reduzierten Freisetzung von infektiösen HCMV Virionen aufgrund einer Beeinträchtigung des sekundären Umhüllungsschrittes führte (Cepeda und Fraile-Ramos, 2011). Auch die früheren Daten des Asna1 homologen Hefeproteins Get3 weisen auf eine Rolle des Proteins beim Transport sowie der Freisetzung

bzw. Fusion von sekretorischen Vesikeln hin (Schuldiner *et al.*, 2005). Ein weiteres Indiz für die direkte Beteiligung von Asna1 an Fusions- und Transportprozessen konnte kürzlich *in vivo* im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) erbracht werden. In dieser Studie wurde gezeigt, dass Asna1 als positiver Regulator des Insulin *Pathways* fungiert, indem es die Sekretion von Insulin unterstützt (Kao *et al.*, 2007).

Ob nun Asna1 vesikuläre Transport- sowie Fusionsprozessen etwa über den SNARE Komplex beeinflusst, was sich schließlich auf die herpesvirale Replikation auswirkt, müsste durch weitere Experimente noch näher untersucht werden. Ein möglicher Ansatz wäre die Etablierung eines Sekretions-Assays in siRNA behandelten Zellen, indem die Sekretions-effizienz eines geeigneten sekretorischen und stabilen Reporterproteins nach Asna1 Depletion untersucht wird. Sollte Asna1 eine von der TA-Biogenese abweichende Funktion innerhalb der Zelle ausüben, welche in der späten Phase der HSV-1 Infektion von Bedeutung ist, könnte dies durch Überexpressionsstudien von Asna1 im Vergleich zu anderen Chaperonen von alternativen TA-Insertionswegen analysiert werden.

5.3.2. PLSCR1 – ein multifunktionaler Wirtsfaktor der HSV-1 Infektion

Die Phospholipid Scramblase 1 wurde ursprünglich als *tail anchor* Protein der Plasmamembran identifiziert, wo es vermutlich für eine schnelle und unspezifische bidirektionale Umverteilung der Phospholipide (PL) als Antwort auf eine erhöhte intrazelluläre Kalzium-Konzentration verantwortlich ist. Folglich wird durch diesen ATP-unabhängigen Prozess die asymmetrische Anordnung der PL aufgelöst, wodurch u.a. die Zellaktivierung oder Apoptose eingeleitet wird. Jedoch gibt es immer mehr Hinweise darauf, dass PLSCR1 auch eine biologische Rolle bei zellulären Signaltransduktionen sowie bei der transkriptionalen Genregulation übernimmt (Sahu *et al.*, 2007). Aufgrund der Vielfalt der Funktionen könnte dieses Wirtspotein auch für das Herpesvirus ein guter Angriffspunkt sein, um zelluläre Prozesse optimal für die herpesvirale Replikation auszubeuten.

Tatsächlich konnte mit den Ergebnissen dieser Arbeit eindeutig ein Einfluss des PLSCR1 Proteins auf den HSV-1 Replikationsverlauf demonstriert werden. Dabei fiel vor allem auf, dass in Abwesenheit des PLSCR1 Proteins um etwa hundertmal weniger HSV-1 Virionen gebildet und ins extrazelluläre Milieu abgegeben werden. Eine mögliche Erklärung wäre der gestörte Virus-Eintritt in die Wirtszelle, so dass allgemein weniger virale Genomkopien in den Zellkern gelangen. Da PLSCR1 u.a. an der Plasmamembran lokalisiert und dort vermutlich für die Veränderung der Phospholipid-Asymmetrie verantwortlich ist, wäre es durchaus möglich, dass es durch seine Scramblase-Aktivität einen Lipid-vermittelten Virus-Eintritt in die Zelle unterstützt. Analog zu Poxviren könnte der herpesvirale Eintritt durch exponiertes Phosphatidylserin auf der Virushülle begünstigt werden. Phosphatidylserin ist unter normalen Bedingungen in der inneren Lipidschicht der Plasmamembran angereichert. Eine

Umverteilung zur äußeren Lipidschicht dient daher als Erkennungssignal zur Aufnahme und Entfernung von apoptotischen Zellen. Dieser als apoptotisches Mimikry bezeichnete Vorgang könnte außer von Poxviren auch von weiteren umhüllten Viren wie z.B. Adenoviren, Picornaviren und auch Herpesviren als Mittel zur Immunevasion genutzt werden (Laliberte und Moss, 2009; Mercer und Helenius, 2009). Viren, die aus einer PLSCR1 depletierten Zelle austreten, wären in der Neuinfektion gestört, was wahrscheinlich zu einem allgemeinen Replikationsdefekt führen könnte. Mit den hier erzielten Ergebnissen kann allerdings eine direkte Funktion des PLSCR1 Proteins beim Eintritt von HSV-1 in die Wirtszelle ausgeschlossen werden. Durch die statistische Auszählung von ICP0-positiven Zellen konnte eine den Kontrollzellen vergleichbare primäre Infektionsrate für PLSCR1 depletierte Zellen nach 4 h Infektion beobachtet werden, was durch direkte Visualisierung von GFP-markierten HSV-1 Capsiden bestätigt wurde. Die Scramblase-Aktivität von PLSCR1, d.h. die Umverteilung von Phospholipiden und/oder andere Funktionen des Proteins scheinen somit für den Eintritt der HSV-1 Virionen primär nicht wichtig zu sein.

Bei der Bindung der viralen Glykoproteine an die entsprechenden Rezeptoren der Plasmamembran werden beim Virus-Eintritt allerdings auch intrazelluläre Signalwege aktiviert, womit in der Wirtszelle optimale Bedingungen für die virale Replikation geschaffen werden (MacLeod und Minson, 2010). Da auch PLSCR1 an mehreren zellulären Signalwegen beteiligt ist, die durch extrazelluläre Signale ausgelöst werden (Pastorelli *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2002), könnte dieses Protein eine wichtige Komponente von zellulären Signaltransduktionswegen sein, welche für den weiteren Verlauf der HSV-1 Replikation von Bedeutung sind. Es könnte aber auch für das Virus einen idealen Angriffspunkt bieten, um bestimmte Signalübertragungen auszuschalten, die normalerweise zur antiviralen Antwort der Zelle aktiviert werden.

Mehrere Studien weisen deutlich darauf hin, dass PLSCR1 auch nukleäre Funktionen ausübt. Dafür spricht zum einen die Identifikation einer nicht-klassischen NLS, über welche PLSCR1 durch einen Rezeptor-vermittelten Transport in den Zellkern gelangt, wo es in der Lage ist, direkt an genomische DNA oder an daran assoziierte nukleäre Komponenten zu binden. Tatsächlich konnte bereits gezeigt werden, dass PLSCR1 an der transkriptionalen Genregulation des Inositol 1,4,5-Triphosphat Rezeptor Typ 1 (IP3-Rezeptor) Gens beteiligt ist und vermutlich auch für weitere zelluläre Gene als Transkriptionsregulator fungiert (Ben-Efraim *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2005). Im Rahmen dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass die herpesvirale Genexpression in Abwesenheit von PLSCR1 stark beeinträchtigt war. Sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Transkriptebeleg konnte in PLSCR1 depletierten Zellen eine verringerte Expression der getesteten HSV-1 Proteine beobachtet werden. Dabei waren mehrere Virusproteine drastisch in ihrer Expression reduziert, nicht jedoch ICP27, was auf eine differentielle Regulation der Genexpression hindeutet. Daher kann die beobachtete

Beeinträchtigung der herpesviralen Genexpression vermutlich mit einer wichtigen Rolle von PLSCR1 bei der transkriptionalen Regulation der HSV-1 Gene begründet werden.

Eine durch die Virusinfektion induzierte Umverteilung des PLSCR1 Proteins von einer überwiegenden TGN-Lokalisation zur Kernperipherie sowie die Interaktion von PLSCR1 mit den NEC-Proteinen deuten zusätzlich auf eine Funktion bei der Auswanderung der Capside aus dem Zellkern hin. Die mit den HSV-1 Proteinen interagierende Domäne im PLSCR1 Protein konnte auf den Aminosäurebereich 106 bis 288 eingeschränkt werden. Erstaunlicherweise sind die N-terminalen Prolin-reichen SH3-Motive von PLSCR1, welche typische Protein-Bindestellen darstellen, für die Interaktion nicht nötig. In der potentiellen Bindestelle der HSV-1 Proteine befinden sich hingegen mehrere Cystein-reiche Palmitoylierungsmotive, welche mitunter für die Stabilisierung der Membranverankerung des Proteins benötigt werden. Als Folge einer fehlenden Palmitoylierung von PLSCR1 konnte eine nukleäre Translokation des Proteins beobachtet werden (Wiedmer *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005). Endogenes PLSCR1 wurde nur in geringen Mengen vorwiegend am TGN detektiert, während es im Verlauf der HSV-1 Infektion zusätzlich an der Kernperipherie, im Cytoplasma sowie an der Plasmamembran gefunden werden konnte. Möglicherweise wird durch die Interaktion mit den herpesviralen Proteinen eine Palmitoylierung von PLSCR1 verhindert, was zu der beobachteten intrazellulären Umverteilung des Proteins führen könnte.

Die Zellkerne bzw. Kernmembranen von PLSCR1 depletierten Zellen wiesen eine extreme Deformation auf. Da dieser auffällige morphologische Phänotyp nur in HSV-1 infizierten siRNA behandelten Hela Zellen beobachtet wurde, ist hierbei ein direkter Zusammenhang zwischen PLSCR1 und der herpesviralen Replikation wahrscheinlich. Einer der ersten sichtbaren Effekte einer HSV-1 Infektion ist die Restrukturierung des Chromatins. Durch die Bildung der Replikationszentren wird das Chromatin immer mehr komprimiert, marginalisiert und schließlich fragmentiert. Gleichzeitig kommt es zur partiellen Auflösung der Lamina, so dass die neu gebildeten Capside Zugang zur INM erlangen. Seit längerem weiß man, dass dafür die NEC-Proteine UL31 und UL34 benötigt werden (Simpson-Holley *et al.*, 2005). Da auch nukleäres PLSCR1 an genomische DNA bzw. Chromatin binden kann (Ben-Efraim *et al.*, 2004; Sahu *et al.*, 2007), wäre es möglich, dass PLSCR1 von den NEC-Proteinen rekrutiert wird und gemeinsam mit diesen und vermutlich weiteren Faktoren zur Umstrukturierung des Zellkerns beiträgt. Falls ein direkter funktionaler Zusammenhang zwischen PLSCR1 und der Auswanderung der Nukleocapside besteht, würde unter HSV-1 UL34 bzw. UL31 deletierten Bedingungen die hier für den HSV-1 Wildtyp beschriebene Deformation des Zellkerns und der Kernmembran in siRNA behandelten Zellen vermutlich nicht auftreten. PLSCR1 könnte auch in seiner postulierten Eigenschaft als Scramblase die Umverteilung der Phospholipide der Kernmembran bewerkstelligen und damit die

Auswanderung von Capsiden aus dem Zellkern begünstigen. Wie bereits unter Abschnitt 4.1 beschrieben, ist die Umstrukturierung der Membranen eine mitunter wichtige Voraussetzung für Krümmungs- und Fusionsprozesse derselben.

PLSCR1 könnte aufgrund seiner identifizierten Funktion als Transkriptionsregulator auch indirekt eine Rolle bei der Umstrukturierung der Kernhüllen-Architektur spielen. Wie bereits erwähnt, induziert PLSCR1 die Expression des IP3-Rezeptors, einem IP3-aktivierten Kalziumkanal des ER. Eine Depletion von PLSCR1 wirkt sich somit negativ auf die zellulären Kalzium-Signalwege aus, welche auch bei Virusinfektionen eine Rolle spielen. Es wurde z.B. gezeigt, dass während einer HCMV Infektion die Menge an IP3 zunimmt, wodurch die Freisetzung von gespeichertem Kalzium durch Öffnung der IP3-Rezeptoren initiiert wird (Keay *et al.*, 1995). Für eine erfolgreiche HSV-1 Infektion sind vermutlich ebenso IP3-vermittelte Kalzium-Signalwege von Bedeutung, da eine erhöhte intrazelluläre Kalziummenge die Freisetzung von HSV1 Virionen erleichtert (Cheshenko *et al.*, 2003; Arimoto *et al.*, 2006). Auch die Aktivierung einer der zwei bis jetzt identifizierten Isoformen der Proteinkinase C (PKC), welche während der Virusinfektion durch die NEC-Proteine UL31 und UL34 zur INM rekrutiert werden und für eine partielle Auflösung der Kernlamina sorgen, erfolgt auf eine Kalzium-abhängige Weise (Muranyi *et al.*, 2002; Simpson-Holley *et al.*, 2005; Park und Baines, 2006). Da in Abwesenheit von PLSCR1 weniger IP3-Rezeptoren exprimiert und folglich weniger intrazelluläres Kalzium freigesetzt wird, könnte somit auch die Aktivierung der PKC beeinträchtigt sein.

Schließlich könnte die identifizierte Wechselwirkung zwischen PLSCR1 und dem HSV-1 UL43 Glykoprotein, einem Typ III-Transmembranprotein, und die partielle Colokalisierung am TGN (Daten nicht gezeigt) auf eine weitere Funktion von PLSCR1 bei der sekundären Umhüllung der HSV-1 Virionen hindeuten. Für das UL43 orthologe Protein von PrV konnte bereits gezeigt werden, dass dieses zwar in Zellkultur nicht essentiell ist, jedoch ein Bestandteil von reifen Virionen ist und vermutlich bei der Modulierung von Fusionsprozessen eine Rolle spielt (Klupp *et al.*, 2005). Die beobachtete Beeinträchtigung der Infektiosität der extrazellulären HSV-1 Virionen in Abwesenheit von PLSCR1 könnte durch eine Rolle dieses Proteins bei der effizienten Rekrutierung von Lipiden und/oder Glykoproteinen in neu gebildete Virionenmembranen erklärt werden.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der multifunktionale Wirtsfaktor PLSCR1 an mehreren herpesviralen Prozessen beteiligt ist. Die Depletion von PLSCR1 hat eine starke Beeinträchtigung der herpesviralen Genexpression, eine auffällige Deformation der Zellkerne sowie einen späten Defekt beim sekundären Umhüllungsprozess zur Folge, welche kumulativ zu einer Beeinträchtigung der HSV-1 Replikation sowie Infektiosität der freigesetzten HSV-1 Virionen führen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. **Abell B. M., Pool M. R., Schlenker O., Sinning I. und High S.** (2004) Signal recognition particle mediates post-translational targeting in eukaryotes. *EMBO J* **23**: 2755-64.
2. **Abell B. M., Rabu C., Leznicki P., Young J. C. und High S.** (2007) Post-translational integration of tail-anchored proteins is facilitated by defined molecular chaperones. *J Cell Sci* **120**: 1743-51.
3. **Arimoto E., Iwai S., Sumi T., Ogawa Y. und Yura Y.** (2006) Involvement of intracellular free Ca²⁺ in enhanced release of herpes simplex virus by hydrogen peroxide. *Virology* **3**: 62.
4. **Baines J. D., Ward P. L., Campadelli-Fiume G. und Roizman B.** (1991) The UL20 gene of herpes simplex virus 1 encodes a function necessary for viral egress. *J Virol* **65**: 6414-24.
5. **Baines J. D.** (2007) Envelopment of herpes simplex virus nucleocapsids at the inner nuclear membrane. In: A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski, P. S. Moore, B. Roizman, R. J. Whitley and K. Yamanishi, *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis.*, Cambridge University Press, Cambridge
6. **Baines J. D., Wills E., Jacob R. J., Pennington J. und Roizman B.** (2007) Glycoprotein M of herpes simplex virus 1 is incorporated into virions during budding at the inner nuclear membrane. *J Virol* **81**: 800-12.
7. **Basse F., Stout J. G., Sims P. J. und Wiedmer T.** (1996) Isolation of an erythrocyte membrane protein that mediates Ca²⁺-dependent transbilayer movement of phospholipid. *J Biol Chem* **271**: 17205-10.
8. **Bateman A., Finn R. D., Sims P. J., Wiedmer T., Biegert A. und Soding J.** (2009) Phospholipid scramblases and Tubby-like proteins belong to a new superfamily of membrane tethered transcription factors. *Bioinformatics* **25**: 159-62.
9. **Batterson W. und Roizman B.** (1983) Characterization of the herpes simplex virion-associated factor responsible for the induction of alpha genes. *J Virol* **46**: 371-7.
10. **Bayliss R., Littlewood T. und Stewart M.** (2000) Structural basis for the interaction between FxFG nucleoporin repeats and importin-beta in nuclear trafficking. *Cell* **102**: 99-108.
11. **Bayliss R., Leung S. W., Baker R. P., Quimby B. B., Corbett A. H. und Stewart M.** (2002) Structural basis for the interaction between NTF2 and nucleoporin FxFG repeats. *EMBO J* **21**: 2843-53.
12. **Ben-Efraim I., Zhou Q., Wiedmer T., Gerace L. und Sims P. J.** (2004) Phospholipid scramblase 1 is imported into the nucleus by a receptor-mediated pathway and interacts with DNA. *Biochemistry* **43**: 3518-26.
13. **Bischoff F. R., Klebe C., Kretschmer J., Wittinghofer A. und Ponstingl H.** (1994) RanGAP1 induces GTPase activity of nuclear Ras-related Ran. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 2587-91.
14. **Bischoff F. R. und Gorlich D.** (1997) RanBP1 is crucial for the release of RanGTP from importin beta-related nuclear transport factors. *FEBS Lett* **419**: 249-54.
15. **Bjerke S. L., Cowan J. M., Kerr J. K., Reynolds A. E., Baines J. D. und Roller R. J.** (2003) Effects of charged cluster mutations on the function of herpes simplex virus type 1 UL34 protein. *J Virol* **77**: 7601-10.
16. **Boehmer P. E. und Lehman I. R.** (1997) Herpes simplex virus DNA replication. *Annu Rev Biochem* **66**: 347-84.
17. **Booy F. P., Trus B. L., Newcomb W. W., Brown J. C., Conway J. F. und Steven A. C.** (1994) Finding a needle in a haystack: detection of a small protein (the 12-kDa VP26) in a large complex (the 200-MDa capsid of herpes simplex virus). *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 5652-6.
18. **Borgese N., Colombo S. und Pedrazzini E.** (2003) The tale of tail-anchored proteins: coming from the cytosol and looking for a membrane. *J Cell Biol* **161**: 1013-9.
19. **Borgese N., Brambillasca S. und Colombo S.** (2007) How tails guide tail-anchored proteins to their destinations. *Curr Opin Cell Biol* **19**: 368-75.
20. **Borgese N. und Fasana E.** (2011) Targeting pathways of C-tail-anchored proteins. *Biochim Biophys Acta* **1808**: 937-46.
21. **Bozkurt G., Stjepanovic G., Vilardi F., Amlacher S., Wild K., Bange G., Favaloro V., Rippe K., Hurt E., Dobberstein B. und Sinning I.** (2009) Structural insights into tail-anchored protein binding and membrane insertion by Get3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 21131-6.
22. **Brambillasca S., Yabal M., Makarow M. und Borgese N.** (2006) Unassisted translocation of large polypeptide domains across phospholipid bilayers. *J Cell Biol* **175**: 767-77.

23. **Braun P., Tasan M., Dreze M., Barrios-Rodiles M., Lemmens I., Yu H., Sahalie J. M., Murray R. R., Roncari L., de Smet A. S., Venkatesan K., Rual J. F., Vandenhoute J., Cusick M. E., Pawson T., Hill D. E., Tavernier J., Wrana J. L., Roth F. P. und Vidal M.** (2009) An experimentally derived confidence score for binary protein-protein interactions. *Nat Methods* **6**: 91-7.
24. **Bryant K. F., Colgrove R. C. und Knipe D. M.** (2011) Cellular SNF2H chromatin-remodeling factor promotes herpes simplex virus 1 immediate-early gene expression and replication. *MBio* **2**: e00330-10.
25. **Camozzi D., Pignatelli S., Valvo C., Lattanzi G., Capanni C., Dal Monte P. und Landini M. P.** (2008) Remodelling of the nuclear lamina during human cytomegalovirus infection: role of the viral proteins pUL50 and pUL53. *J Gen Virol* **89**: 731-40.
26. **Cepeda V. und Fraile-Ramos A.** (2011) A role for the SNARE protein syntaxin 3 in human cytomegalovirus morphogenesis. *Cell Microbiol* **13**: 846-58.
27. **Chan R. B., Tanner L. und Wenk M. R.** (2010) Implications for lipids during replication of enveloped viruses. *Chem Phys Lipids* **163**: 449-59.
28. **Chang J. T., Schmid M. F., Rixon F. J. und Chiu W.** (2007) Electron cryotomography reveals the portal in the herpesvirus capsid. *J Virol* **81**: 2065-8.
29. **Chang Y. E. und Roizman B.** (1993) The product of the UL31 gene of herpes simplex virus 1 is a nuclear phosphoprotein which partitions with the nuclear matrix. *J Virol* **67**: 6348-56.
30. **Chang Y. E., Van Sant C., Krug P. W., Sears A. E. und Roizman B.** (1997) The null mutant of the U(L)31 gene of herpes simplex virus 1: construction and phenotype in infected cells. *J Virol* **71**: 8307-15.
31. **Chang Y. W., Chuang Y. C., Ho Y. C., Cheng M. Y., Sun Y. J., Hsiao C. D. und Wang C.** (2010) Crystal structure of Get4-Get5 complex and its interactions with Sgt2, Get3, and Ydj1. *J Biol Chem* **285**: 9962-70.
32. **Chen C. M., Misra T. K., Silver S. und Rosen B. P.** (1986) Nucleotide sequence of the structural genes for an anion pump. The plasmid-encoded arsenical resistance operon. *J Biol Chem* **261**: 15030-8.
33. **Chen M. H., Ben-Efraim I., Mitrousis G., Walker-Kopp N., Sims P. J. und Cingolani G.** (2005) Phospholipid scramblase 1 contains a nonclassical nuclear localization signal with unique binding site in importin alpha. *J Biol Chem* **280**: 10599-606.
34. **Cheshenko N., Del Rosario B., Woda C., Marcellino D., Satlin L. M. und Herold B. C.** (2003) Herpes simplex virus triggers activation of calcium-signaling pathways. *J Cell Biol* **163**: 283-93.
35. **Claessen J. H., Mueller B., Spooner E., Pivorunas V. L. und Ploegh H. L.** (2010) The transmembrane segment of a tail-anchored protein determines its degradative fate through dislocation from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **285**: 20732-9.
36. **Clement C., Tiwari V., Scanlan P. M., Valyi-Nagy T., Yue B. Y. und Shukla D.** (2006) A novel role for phagocytosis-like uptake in herpes simplex virus entry. *J Cell Biol* **174**: 1009-21.
37. **Cockrell S. K., Sanchez M. E., Erazo A. und Homa F. L.** (2009) Role of the UL25 protein in herpes simplex virus DNA encapsidation. *J Virol* **83**: 47-57.
38. **Colombo S. F., Longhi R. und Borgese N.** (2009) The role of cytosolic proteins in the insertion of tail-anchored proteins into phospholipid bilayers. *J Cell Sci* **122**: 2383-92.
39. **Corrigan D. P., Kuszczak D., Rusinol A. E., Thewke D. P., Hrycyna C. A., Michaelis S. und Sinensky M. S.** (2005) Prelamin A endoproteolytic processing in vitro by recombinant Zmpste24. *Biochem J* **387**: 129-38.
40. **Cory S. und Adams J. M.** (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* **2**: 647-56.
41. **Cronshaw J. M., Krutchinsky A. N., Zhang W., Chait B. T. und Matunis M. J.** (2002) Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J Cell Biol* **158**: 915-27.
42. **Cross B. C., Sinning I., Luirink J. und High S.** (2009) Delivering proteins for export from the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 255-64.
43. **Dal Monte P., Pignatelli S., Zini N., Maraldi N. M., Perret E., Prevost M. C. und Landini M. P.** (2002) Analysis of intracellular and intraviral localization of the human cytomegalovirus UL53 protein. *J Gen Virol* **83**: 1005-12.
44. **Davison A. J., Eberle R., Ehlers B., Hayward G. S., McGeoch D. J., Minson A. C., Pellett P. E., Roizman B., Studdert M. J. und Thiry E.** (2009) The order Herpesvirales. *Arch Virol* **154**: 171-7.
45. **Dingwell K. S. und 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**: 8933-42.
46. **Dolken L., Krmpotic A., Kothe S., Tuddenham L., Tanguy M., Marcinowski L., Ruzsics Z., Elefant N., Altuvia Y., Margalit H., Koszinowski U. H., Jonjic S. und Pfeffer S.** (2010)

- Cytomegalovirus microRNAs facilitate persistent virus infection in salivary glands. *PLoS Pathog* **6**: e1001150.
47. **Fahrenkrog B., Stoffler D. und Aebi U.** (2001) Nuclear pore complex architecture and functional dynamics. *Curr Top Microbiol Immunol* **259**: 95-117.
 48. **Fairley E. A., Kendrick-Jones J. und Ellis J. A.** (1999) The Emery-Dreifuss muscular dystrophy phenotype arises from aberrant targeting and binding of emerin at the inner nuclear membrane. *J Cell Sci* **112 (Pt 15)**: 2571-82.
 49. **Farina A., Santarelli R., Gonnella R., Bei R., Muraro R., Cardinali G., Uccini S., Ragona G., Frati L., Faggioni A. und Angeloni A.** (2000) The BFRF1 gene of Epstein-Barr virus encodes a novel protein. *J Virol* **74**: 3235-44.
 50. **Farnsworth A. und Johnson D. C.** (2006) Herpes simplex virus gE/gI must accumulate in the trans-Golgi network at early times and then redistribute to cell junctions to promote cell-cell spread. *J Virol* **80**: 3167-79.
 51. **Farnsworth A., Wisner T. W., Webb M., Roller R., Cohen G., Eisenberg R. und Johnson D. C.** (2007) Herpes simplex virus glycoproteins gB and gH function in fusion between the virion envelope and the outer nuclear membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 10187-92.
 52. **Favaloro V., Spasic M., Schwappach B. und Dobberstein B.** (2008) Distinct targeting pathways for the membrane insertion of tail-anchored (TA) proteins. *J Cell Sci* **121**: 1832-40.
 53. **Fields S. und Song O.** (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**: 245-6.
 54. **Fleischer T. C., Weaver C. M., McAfee K. J., Jennings J. L. und Link A. J.** (2006) Systematic identification and functional screens of uncharacterized proteins associated with eukaryotic ribosomal complexes. *Genes Dev* **20**: 1294-307.
 55. **Foisner R.** (2001) Inner nuclear membrane proteins and the nuclear lamina. *J Cell Sci* **114**: 3791-2.
 56. **Foster T. P., Chouljenko V. N. und Kousoulas K. G.** (2008) Functional and physical interactions of the herpes simplex virus type 1 UL20 membrane protein with glycoprotein K. *J Virol* **82**: 6310-23.
 57. **Fried H. und Kutay U.** (2003) Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory. *Cell Mol Life Sci* **60**: 1659-88.
 58. **Fuchs W., Klupp B. G., Granzow H., Osterrieder N. und Mettenleiter T. C.** (2002) The interacting UL31 and UL34 gene products of pseudorabies virus are involved in egress from the host-cell nucleus and represent components of primary enveloped but not mature virions. *J Virol* **76**: 364-78.
 59. **Gibson W. und Roizman B.** (1972) Proteins specified by herpes simplex virus. 8. Characterization and composition of multiple capsid forms of subtypes 1 and 2. *J Virol* **10**: 1044-52.
 60. **Gonnella R., Farina A., Santarelli R., Raffa S., Feederle R., Bei R., Granato M., Modesti A., Frati L., Delecluse H. J., Torrisi M. R., Angeloni A. und Faggioni A.** (2005) Characterization and intracellular localization of the Epstein-Barr virus protein BFLF2: interactions with BFRF1 and with the nuclear lamina. *J Virol* **79**: 3713-27.
 61. **Gorlich D., Henklein P., Laskey R. A. und Hartmann E.** (1996) A 41 amino acid motif in importin-alpha confers binding to importin-beta and hence transit into the nucleus. *EMBO J* **15**: 1810-7.
 62. **Gorlich D. und Kutay U.** (1999) Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**: 607-60.
 63. **Graham T. R. und Kozlov M. M.** (2010) Interplay of proteins and lipids in generating membrane curvature. *Curr Opin Cell Biol* **22**: 430-6.
 64. **Granato M., Feederle R., Farina A., Gonnella R., Santarelli R., Hub B., Faggioni A. und Delecluse H. J.** (2008) Deletion of Epstein-Barr virus BFLF2 leads to impaired viral DNA packaging and primary egress as well as to the production of defective viral particles. *J Virol* **82**: 4042-51.
 65. **Granzow H., Weiland F., Jons A., Klupp B. G., Karger A. und Mettenleiter T. C.** (1997) Ultrastructural analysis of the replication cycle of pseudorabies virus in cell culture: a reassessment. *J Virol* **71**: 2072-82.
 66. **Granzow H., Klupp B. G., Fuchs W., Veits J., Osterrieder N. und Mettenleiter T. C.** (2001) Egress of alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study. *J Virol* **75**: 3675-84.
 67. **Gray C. P. und Kaerner H. C.** (1984) Sequence of the putative origin of replication in the UL region of herpes simplex virus type 1 ANG DNA. *J Gen Virol* **65 (Pt 12)**: 2109-19.
 68. **Grunewald K., Desai P., Winkler D. C., Heymann J. B., Belnap D. M., Baumeister W. und Steven A. C.** (2003) Three-dimensional structure of herpes simplex virus from cryo-electron tomography. *Science* **302**: 1396-8.

69. **Hellenbrand W., Thierfelder W., Muller-Pebody B., Hamouda O. und Breuer T.** (2005) Seroprevalence of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) in former East and West Germany, 1997-1998. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **24**: 131-5.
70. **Heymann J. B., Cheng N., Newcomb W. W., Trus B. L., Brown J. C. und Steven A. C.** (2003) Dynamics of herpes simplex virus capsid maturation visualized by time-lapse cryo-electron microscopy. *Nat Struct Biol* **10**: 334-41.
71. **Holland L. E., Sandri-Goldin R. M., Goldin A. L., Glorioso J. C. und Levine M.** (1984) Transcriptional and genetic analyses of the herpes simplex virus type 1 genome: coordinates 0.29 to 0.45. *J Virol* **49**: 947-59.
72. **Honess R. W. und Roizman B.** (1974) Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *J Virol* **14**: 8-19.
73. **Horie C., Suzuki H., Sakaguchi M. und Mihara K.** (2002) Characterization of signal that directs C-tail-anchored proteins to mammalian mitochondrial outer membrane. *Mol Biol Cell* **13**: 1615-25.
74. **Horst D., Favaloro V., Vilardi F., van Leeuwen H. C., Garstka M. A., Hislop A. D., Rabu C., Kremmer E., Rickinson A. B., High S., Dobberstein B., Rensing M. E. und Wiertz E. J.** (2011) EBV protein BNLF2a exploits host tail-anchored protein integration machinery to inhibit TAP. *J Immunol* **186**: 3594-605.
75. **Izaurrealde E., Kutay U., von Kobbe C., Mattaj I. W. und Gorlich D.** (1997) The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus. *EMBO J* **16**: 6535-47.
76. **Jacob R. J., Morse L. S. und 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**: 448-57.
77. **Jahn R. und Scheller R. H.** (2006) SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 631-43.
78. **Johnson D. C. und Spear P. G.** (1982) Monensin inhibits the processing of herpes simplex virus glycoproteins, their transport to the cell surface, and the egress of virions from infected cells. *J Virol* **43**: 1102-12.
79. **Johnson D. C., Webb M., Wisner T. W. und Brunetti C.** (2001) Herpes simplex virus gE/gI sorts nascent virions to epithelial cell junctions, promoting virus spread. *J Virol* **75**: 821-33.
80. **Johnson D. C., Wisner T. W. und Wright C. C.** (2011) Herpes simplex virus glycoproteins gB and gD function in a redundant fashion to promote secondary envelopment. *J Virol* **85**: 4910-26.
81. **Jonikas M. C., Collins S. R., Denic V., Oh E., Quan E. M., Schmid V., Weibezahn J., Schwappach B., Walter P., Weissman J. S. und Schuldiner M.** (2009) Comprehensive characterization of genes required for protein folding in the endoplasmic reticulum. *Science* **323**: 1693-7.
82. **Kalbfleisch T., Cambon A. und Wattenberg B. W.** (2007) A bioinformatics approach to identifying tail-anchored proteins in the human genome. *Traffic* **8**: 1687-94.
83. **Kalderon D., Roberts B. L., Richardson W. D. und Smith A. E.** (1984) A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* **39**: 499-509.
84. **Kao G., Nordenson C., Still M., Ronnlund A., Tuck S. und Naredi P.** (2007) ASNA-1 positively regulates insulin secretion in *C. elegans* and mammalian cells. *Cell* **128**: 577-87.
85. **Kaufmann T., Schlipf S., Sanz J., Neubert K., Stein R. und Borner C.** (2003) Characterization of the signal that directs Bcl-x(L), but not Bcl-2, to the mitochondrial outer membrane. *J Cell Biol* **160**: 53-64.
86. **Keay S., Baldwin B. R., Smith M. W., Wasserman S. S. und Goldman W. F.** (1995) Increases in $[Ca^{2+}]_i$ mediated by the 92.5-kDa putative cell membrane receptor for HCMV gp86. *Am J Physiol* **269**: C11-21.
87. **Kim P. K., Hollerbach C., Trimble W. S., Leber B. und Andrews D. W.** (1999) Identification of the endoplasmic reticulum targeting signal in vesicle-associated membrane proteins. *J Biol Chem* **274**: 36876-82.
88. **Klebe C., Prinz H., Wittinghofer A. und Goody R. S.** (1995) The kinetic mechanism of Ran--nucleotide exchange catalyzed by RCC1. *Biochemistry* **34**: 12543-52.
89. **Klupp B., Altenschmidt J., Granzow H., Fuchs W. und Mettenleiter T. C.** (2008) Glycoproteins required for entry are not necessary for egress of pseudorabies virus. *J Virol* **82**: 6299-309.
90. **Klupp B. G., Granzow H. und Mettenleiter T. C.** (2000) Primary envelopment of pseudorabies virus at the nuclear membrane requires the UL34 gene product. *J Virol* **74**: 10063-73.

91. **Klupp B. G., Granzow H. und Mettenleiter T. C.** (2001) Effect of the pseudorabies virus US3 protein on nuclear membrane localization of the UL34 protein and virus egress from the nucleus. *J Gen Virol* **82**: 2363-71.
92. **Klupp B. G., Altenschmidt J., Granzow H., Fuchs W. und Mettenleiter T. C.** (2005) Identification and characterization of the pseudorabies virus UL43 protein. *Virology* **334**: 224-33.
93. **Klupp B. G., Granzow H., Keil G. M. und Mettenleiter T. C.** (2006) The capsid-associated UL25 protein of the alphaherpesvirus pseudorabies virus is nonessential for cleavage and encapsidation of genomic DNA but is required for nuclear egress of capsids. *J Virol* **80**: 6235-46.
94. **Klupp B. G., Granzow H., Fuchs W., Keil G. M., Finke S. und Mettenleiter T. C.** (2007) Vesicle formation from the nuclear membrane is induced by coexpression of two conserved herpesvirus proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 7241-6.
95. **Koshizuka T., Goshima F., Takakuwa H., Nozawa N., Daikoku T., Koizumi O. und Nishiyama Y.** (2002) Identification and characterization of the UL56 gene product of herpes simplex virus type 2. *J Virol* **76**: 6718-28.
96. **Kuhn J., Leege T., Klupp B. G., Granzow H., Fuchs W. und Mettenleiter T. C.** (2008) Partial functional complementation of a pseudorabies virus UL25 deletion mutant by herpes simplex virus type 1 pUL25 indicates overlapping functions of alphaherpesvirus pUL25 proteins. *J Virol* **82**: 5725-34.
97. **Kurdi-Haidar B., Hom D. K., Flittner D. E., Heath D., Fink L., Naredi P. und Howell S. B.** (1998) Dual cytoplasmic and nuclear distribution of the novel arsenite-stimulated human ATPase (hASNA-I). *J Cell Biochem* **71**: 1-10.
98. **Kutay U., Hartmann E. und Rapoport T. A.** (1993) A class of membrane proteins with a C-terminal anchor. *Trends Cell Biol* **3**: 72-5.
99. **Kutay U., Bischoff F. R., Kostka S., Kraft R. und Gorlich D.** (1997) Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell* **90**: 1061-71.
100. **Kwong A. D. und Frenkel N.** (1989) The herpes simplex virus virion host shutoff function. *J Virol* **63**: 4834-9.
101. **Laemmli U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-5.
102. **Lake C. M. und Hutt-Fletcher L. M.** (2004) The Epstein-Barr virus BFRF1 and BFLF2 proteins interact and coexpression alters their cellular localization. *Virology* **320**: 99-106.
103. **Laliberte J. P. und Moss B.** (2009) Appraising the apoptotic mimicry model and the role of phospholipids for poxvirus entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 17517-21.
104. **Lamberti C. und Weller S. K.** (1998) The herpes simplex virus type 1 cleavage/packaging protein, UL32, is involved in efficient localization of capsids to replication compartments. *J Virol* **72**: 2463-73.
105. **Lamesch P., Li N., Milstein S., Fan C., Hao T., Szabo G., Hu Z., Venkatesan K., Bethel G., Martin P., Rogers J., Lawlor S., McLaren S., Dricot A., Borick H., Cusick M. E., Vandenhaute J., Dunham I., Hill D. E. und Vidal M.** (2007) hORFeome v3.1: a resource of human open reading frames representing over 10,000 human genes. *Genomics* **89**: 307-15.
106. **Lange A., Mills R. E., Lange C. J., Stewart M., Devine S. E. und Corbett A. H.** (2007) Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. *J Biol Chem* **282**: 5101-5.
107. **Leach N., Bjerke S. L., Christensen D. K., Bouchard J. M., Mou F., Park R., Baines J., Haraguchi T. und Roller R. J.** (2007) Emerin is hyperphosphorylated and redistributed in herpes simplex virus type 1-infected cells in a manner dependent on both UL34 and US3. *J Virol* **81**: 10792-803.
108. **Lee S. J., Matsuura Y., Liu S. M. und Stewart M.** (2005) Structural basis for nuclear import complex dissociation by RanGTP. *Nature* **435**: 693-6.
109. **Lehman I. R. und Boehmer P. E.** (1999) Replication of herpes simplex virus DNA. *J Biol Chem* **274**: 28059-62.
110. **Leipe D. D., Wolf Y. I., Koonin E. V. und Aravind L.** (2002) Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *J Mol Biol* **317**: 41-72.
111. **Leuzinger H., Ziegler U., Schraner E. M., Fraefel C., Glauser D. L., Heid I., Ackermann M., Mueller M. und Wild P.** (2005) Herpes simplex virus 1 envelopment follows two diverse pathways. *J Virol* **79**: 13047-59.
112. **Leznicki P., Clancy A., Schwappach B. und High S.** (2010) Bat3 promotes the membrane integration of tail-anchored proteins. *J Cell Sci* **123**: 2170-8.

113. **Liang L., Tanaka M., Kawaguchi Y. und Baines J. D.** (2004) Cell lines that support replication of a novel herpes simplex virus 1 UL31 deletion mutant can properly target UL34 protein to the nuclear rim in the absence of UL31. *Virology* **329**: 68-76.
114. **Liang L. und Baines J. D.** (2005) Identification of an essential domain in the herpes simplex virus 1 UL34 protein that is necessary and sufficient to interact with UL31 protein. *J Virol* **79**: 3797-806.
115. **Loret S., Guay G. und Lippe R.** (2008) Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions. *J Virol* **82**: 8605-18.
116. **Lotzerich M., Ruzsics Z. und Koszinowski U. H.** (2006) Functional domains of murine cytomegalovirus nuclear egress protein M53/p38. *J Virol* **80**: 73-84.
117. **Lötzerich M.** (2007) Analysis of the nuclear egress complex of mouse cytomegalovirus. Dissertation, LMU München
118. **Lundmark R. und Carlsson S. R.** (2010) Driving membrane curvature in clathrin-dependent and clathrin-independent endocytosis. *Semin Cell Dev Biol* **21**: 363-70.
119. **Lusk C. P., Blobel G. und King M. C.** (2007) Highway to the inner nuclear membrane: rules for the road. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 414-20.
120. **Lyman M. G., Kemp C. D., Taylor M. P. und Enquist L. W.** (2009) Comparison of the pseudorabies virus Us9 protein with homologs from other veterinary and human alphaherpesviruses. *J Virol* **83**: 6978-86.
121. **MacLeod I. J. und Minson T.** (2010) Binding of herpes simplex virus type-1 virions leads to the induction of intracellular signalling in the absence of virus entry. *PLoS One* **5**: e9560.
122. **Mariappan M., Li X., Stefanovic S., Sharma A., Mateja A., Keenan R. J. und Hegde R. S.** (2010) A ribosome-associating factor chaperones tail-anchored membrane proteins. *Nature* **466**: 1120-4.
123. **Mateja A., Szlachcic A., Downing M. E., Dobosz M., Mariappan M., Hegde R. S. und Keenan R. J.** (2009) The structural basis of tail-anchored membrane protein recognition by Get3. *Nature* **461**: 361-6.
124. **Matis J. und Kudelova M.** (2001) Early shutoff of host protein synthesis in cells infected with herpes simplex viruses. *Acta Virol* **45**: 269-77.
125. **Matsuura Y. und Stewart M.** (2005) Nup50/Npap60 function in nuclear protein import complex disassembly and importin recycling. *EMBO J* **24**: 3681-9.
126. **Maurer U. E., Sodeik B. und Grunewald K.** (2008) Native 3D intermediates of membrane fusion in herpes simplex virus 1 entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 10559-64.
127. **McGeoch D. J., Dolan A., Donald S. und Rixon F. J.** (1985) Sequence determination and genetic content of the short unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *J Mol Biol* **181**: 1-13.
128. **McGeoch D. J., Dolan A., Donald S. und 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**: 1727-45.
129. **McGeoch D. J., Dalrymple M. A., Davison A. J., Dolan A., Frame M. C., McNab D., Perry L. J., Scott J. E. und 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 (Pt 7)**: 1531-74.
130. **McLauchlan J. und Rixon F. J.** (1992) Characterization of enveloped tegument structures (L particles) produced by alphaherpesviruses: integrity of the tegument does not depend on the presence of capsid or envelope. *J Gen Virol* **73 (Pt 2)**: 269-76.
131. **McMahon H. T. und Gallop J. L.** (2005) Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature* **438**: 590-6.
132. **McNabb D. S. und Courtney R. J.** (1992) Characterization of the large tegument protein (ICP1/2) of herpes simplex virus type 1. *Virology* **190**: 221-32.
133. **Mercer J. und Helenius A.** (2009) Virus entry by macropinocytosis. *Nat Cell Biol* **11**: 510-20.
134. **Messerle M., Crnkovic I., Hammerschmidt W., Ziegler H. und Koszinowski U. H.** (1997) Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 14759-63.
135. **Mettenleiter T. C.** (2002) Herpesvirus assembly and egress. *J Virol* **76**: 1537-47.
136. **Mettenleiter T. C.** (2004) Budding events in herpesvirus morphogenesis. *Virus Res* **106**: 167-80.
137. **Mettenleiter T. C., Klupp B. G. und Granzow H.** (2009) Herpesvirus assembly: an update. *Virus Res* **143**: 222-34.
138. **Modrow S., Falke D., Truyen U. und Schätzl H.** (2010) Herpesviren. In: *Molekulare Virologie, 3. Auflage*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

139. **Morris J. B., Hofemeister H. und O'Hare P.** (2007) Herpes simplex virus infection induces phosphorylation and delocalization of emerin, a key inner nuclear membrane protein. *J Virol* **81**: 4429-37.
140. **Motz C., Martin H., Krimmer T. und Rassow J.** (2002) Bcl-2 and porin follow different pathways of TOM-dependent insertion into the mitochondrial outer membrane. *J Mol Biol* **323**: 729-38.
141. **Mou F., Wills E. G., Park R. und Baines J. D.** (2008) Effects of lamin A/C, lamin B1, and viral US3 kinase activity on viral infectivity, virion egress, and the targeting of herpes simplex virus U(L)34-encoded protein to the inner nuclear membrane. *J Virol* **82**: 8094-104.
142. **Mou F., Wills E. und Baines J. D.** (2009) Phosphorylation of the U(L)31 protein of herpes simplex virus 1 by the U(S)3-encoded kinase regulates localization of the nuclear envelopment complex and egress of nucleocapsids. *J Virol* **83**: 5181-91.
143. **Muranyi W., Haas J., Wagner M., Krohne G. und Koszinowski U. H.** (2002) Cytomegalovirus recruitment of cellular kinases to dissolve the nuclear lamina. *Science* **297**: 854-7.
144. **Muylaert I. und Elias P.** (2007) Knockdown of DNA ligase IV/XRCC4 by RNA interference inhibits herpes simplex virus type I DNA replication. *J Biol Chem* **282**: 10865-72.
145. **Nagel C. H., Dohner K., Fathollahy M., Strive T., Borst E. M., Messerle M. und Sodeik B.** (2008) Nuclear egress and envelopment of herpes simplex virus capsids analyzed with dual-color fluorescence HSV1(17+). *J Virol* **82**: 3109-24.
146. **Newcomb W. W., Homa F. L., Thomsen D. R., Booy F. P., Trus B. L., Steven A. C., Spencer J. V. und Brown J. C.** (1996) Assembly of the herpes simplex virus capsid: characterization of intermediates observed during cell-free capsid formation. *J Mol Biol* **263**: 432-46.
147. **Newcomb W. W., Juhas R. M., Thomsen D. R., Homa F. L., Burch A. D., Weller S. K. und Brown J. C.** (2001) The UL6 gene product forms the portal for entry of DNA into the herpes simplex virus capsid. *J Virol* **75**: 10923-32.
148. **Newcomb W. W., Thomsen D. R., Homa F. L. und Brown J. C.** (2003) Assembly of the herpes simplex virus capsid: identification of soluble scaffold-portal complexes and their role in formation of portal-containing capsids. *J Virol* **77**: 9862-71.
149. **Nguyen M., Millar D. G., Yong V. W., Korsmeyer S. J. und Shore G. C.** (1993) Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. *J Biol Chem* **268**: 25265-8.
150. **Nicola A. V., McEvoy A. M. und Straus S. E.** (2003) Roles for endocytosis and low pH in herpes simplex virus entry into HeLa and Chinese hamster ovary cells. *J Virol* **77**: 5324-32.
151. **Ogasawara M., Suzutani T., Yoshida I. und Azuma M.** (2001) Role of the UL25 gene product in packaging DNA into the herpes simplex virus capsid: location of UL25 product in the capsid and demonstration that it binds DNA. *J Virol* **75**: 1427-36.
152. **Ojala P. M., Sodeik B., Ebersold M. W., Kutay U. und Helenius A.** (2000) Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro. *Mol Cell Biol* **20**: 4922-31.
153. **Ott M., Tascher G., Hassdenteufel S., Zimmermann R., Haas J. und Bailer S. M.** (2011) Functional characterization of the essential tail-anchor of the HSV-1 nuclear egress protein UL34. *J Gen Virol*
154. **Park R. und Baines J. D.** (2006) Herpes simplex virus type 1 infection induces activation and recruitment of protein kinase C to the nuclear membrane and increased phosphorylation of lamin B. *J Virol* **80**: 494-504.
155. **Pastorelli C., Veiga J., Charles N., Voignier E., Moussu H., Monteiro R. C. und Benhamou M.** (2001) IgE receptor type I-dependent tyrosine phosphorylation of phospholipid scramblase. *J Biol Chem* **276**: 20407-12.
156. **Patel A., Hanson J., McLean T. I., Olgiate J., Hilton M., Miller W. E. und Bachenheimer S. L.** (1998) Herpes simplex type 1 induction of persistent NF-kappa B nuclear translocation increases the efficiency of virus replication. *Virology* **247**: 212-22.
157. **Pellett P. E. und Roizman B.** (2007) The family Herpesviridae: a brief introduction. In: D. M. Knipe and P. M. Howley, *Fields Virology (fünfte Edition)*, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia
158. **Perry L. J. und McGeoch D. J.** (1988) The DNA sequences of the long repeat region and adjoining parts of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol* **69 (Pt 11)**: 2831-46.
159. **Pogoda M., Bosse J. B., Ruzsics Z. und Koszinowski U. H.** (2011) Homotypic interaction of M53 is crucial for nuclear maturation of MCMV capsids. Posterpräsentation, GfV-Tagung, Freiburg

160. **Popa M., Ruzsics Z., Lotzerich M., Dolken L., Buser C., Walther P. und Koszinowski U. H.** (2010) Dominant negative mutants of the murine cytomegalovirus M53 gene block nuclear egress and inhibit capsid maturation. *J Virol* **84**: 9035-46.
161. **Purves F. C., Spector D. und Roizman B.** (1991) The herpes simplex virus 1 protein kinase encoded by the US3 gene mediates posttranslational modification of the phosphoprotein encoded by the UL34 gene. *J Virol* **65**: 5757-64.
162. **Rabu C., Wipf P., Brodsky J. L. und High S.** (2008) A precursor-specific role for Hsp40/Hsc70 during tail-anchored protein integration at the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **283**: 27504-13.
163. **Rabu C., Schmid V., Schwappach B. und High S.** (2009) Biogenesis of tail-anchored proteins: the beginning for the end? *J Cell Sci* **122**: 3605-12.
164. **Rajcani J., Andrea V. und Ingeborg R.** (2004) Peculiarities of herpes simplex virus (HSV) transcription: an overview. *Virus Genes* **28**: 293-310.
165. **Rapaport D.** (2003) Finding the right organelle. Targeting signals in mitochondrial outer-membrane proteins. *EMBO Rep* **4**: 948-52.
166. **Raschbichler V.** (2011) Genomweite Analyse des nukleo-cytoplasmatischen Transports herpesviraler Proteine. Dissertation, LMU München
167. **Remillard-Labrosse G., Guay G. und Lippe R.** (2006) Reconstitution of herpes simplex virus type 1 nuclear capsid egress in vitro. *J Virol* **80**: 9741-53.
168. **Rexach M. und Blobel G.** (1995) Protein import into nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins. *Cell* **83**: 683-92.
169. **Reynolds A. E., Ryckman B. J., Baines J. D., Zhou Y., Liang L. und Roller R. J.** (2001) U(L)31 and U(L)34 proteins of herpes simplex virus type 1 form a complex that accumulates at the nuclear rim and is required for envelopment of nucleocapsids. *J Virol* **75**: 8803-17.
170. **Reynolds A. E., Wills E. G., Roller R. J., Ryckman B. J. und Baines J. D.** (2002) Ultrastructural localization of the herpes simplex virus type 1 UL31, UL34, and US3 proteins suggests specific roles in primary envelopment and egress of nucleocapsids. *J Virol* **76**: 8939-52.
171. **Reynolds A. E., Liang L. und Baines J. D.** (2004) Conformational changes in the nuclear lamina induced by herpes simplex virus type 1 require genes U(L)31 and U(L)34. *J Virol* **78**: 5564-75.
172. **Ribbeck K., Lipowsky G., Kent H. M., Stewart M. und Gorlich D.** (1998) NTF2 mediates nuclear import of Ran. *EMBO J* **17**: 6587-98.
173. **Robbins J., Dilworth S. M., Laskey R. A. und Dingwall C.** (1991) Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* **64**: 615-23.
174. **Roberts K. L. und Baines J. D.** (2011) UL31 of herpes simplex virus 1 is necessary for optimal NF-kappaB activation and expression of viral gene products. *J Virol* **85**: 4947-53.
175. **Roizman B., Knipe D. M. und Whitley R. J.** (2007) Herpes simplex viruses. In: D. M. Knipe and P. M. Howley, *Fields Virology (fünfte Edition)*, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia
176. **Roller R. J., Zhou Y., Schnetzer R., Ferguson J. und DeSalvo D.** (2000) Herpes simplex virus type 1 U(L)34 gene product is required for viral envelopment. *J Virol* **74**: 117-29.
177. **Roller R. J., Bjerke S. L., Haugo A. C. und Hanson S.** (2010) Analysis of a charge cluster mutation of herpes simplex virus type 1 UL34 and its extragenic suppressor suggests a novel interaction between pUL34 and pUL31 that is necessary for membrane curvature around capsids. *J Virol* **84**: 3921-34.
178. **Rout M. P. und Aitchison J. D.** (2000) Pore relations: nuclear pore complexes and nucleocytoplasmic exchange. *Essays Biochem* **36**: 75-88.
179. **Ryckman B. J. und Roller R. J.** (2004) Herpes simplex virus type 1 primary envelopment: UL34 protein modification and the US3-UL34 catalytic relationship. *J Virol* **78**: 399-412.
180. **Sahu S. K., Gummadi S. N., Manoj N. und Aradhyam G. K.** (2007) Phospholipid scramblases: an overview. *Arch Biochem Biophys* **462**: 103-14.
181. **Salaun C., James D. J., Greaves J. und Chamberlain L. H.** (2004) Plasma membrane targeting of exocytic SNARE proteins. *Biochim Biophys Acta* **1693**: 81-9.
182. **Santarelli R., Farina A., Granato M., Gonnella R., Raffa S., Leone L., Bei R., Modesti A., Frati L., Torrisi M. R. und Faggioni A.** (2008) Identification and characterization of the product encoded by ORF69 of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* **82**: 4562-72.
183. **Sanyal S. und Menon A. K.** (2009) Flipping lipids: why an' what's the reason for? *ACS Chem Biol* **4**: 895-909.
184. **Schmidt T., Striebinger H., Haas J. und Bailer S. M.** (2010) The heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is important for Herpes simplex virus-1 propagation. *FEBS Lett* **584**: 4361-5.

185. **Schnee M., Ruzsics Z., Bubeck A. und Koszinowski U. H.** (2006) Common and specific properties of herpesvirus UL34/UL31 protein family members revealed by protein complementation assay. *J Virol* **80**: 11658-66.
186. **Schuldiner M., Collins S. R., Thompson N. J., Denic V., Bhamidipati A., Punna T., Ihmels J., Andrews B., Boone C., Greenblatt J. F., Weissman J. S. und Krogan N. J.** (2005) Exploration of the function and organization of the yeast early secretory pathway through an epistatic miniarray profile. *Cell* **123**: 507-19.
187. **Schuldiner M., Metz J., Schmid V., Denic V., Rakwalska M., Schmitt H. D., Schwappach B. und Weissman J. S.** (2008) The GET complex mediates insertion of tail-anchored proteins into the ER membrane. *Cell* **134**: 634-45.
188. **Scott E. S. und O'Hare P.** (2001) Fate of the inner nuclear membrane protein lamin B receptor and nuclear lamins in herpes simplex virus type 1 infection. *J Virol* **75**: 8818-30.
189. **Setoguchi K., Otera H. und Mihara K.** (2006) Cytosolic factor- and TOM-independent import of C-tail-anchored mitochondrial outer membrane proteins. *EMBO J* **25**: 5635-47.
190. **Sheaffer A. K., Newcomb W. W., Gao M., Yu D., Weller S. K., Brown J. C. und Tenney D. J.** (2001) Herpes simplex virus DNA cleavage and packaging proteins associate with the procapsid prior to its maturation. *J Virol* **75**: 687-98.
191. **Shiba C., Daikoku T., Goshima F., Takakuwa H., Yamauchi Y., Koizumi O. und Nishiyama Y.** (2000) The UL34 gene product of herpes simplex virus type 2 is a tail-anchored type II membrane protein that is significant for virus envelopment. *J Gen Virol* **81**: 2397-405.
192. **Simpson-Holley M., Colgrove R. C., Nalepa G., Harper J. W. und Knipe D. M.** (2005) Identification and functional evaluation of cellular and viral factors involved in the alteration of nuclear architecture during herpes simplex virus 1 infection. *J Virol* **79**: 12840-51.
193. **Skepper J. N., Whiteley A., Browne H. und Minson A.** (2001) Herpes simplex virus nucleocapsids mature to progeny virions by an envelopment --> deenvelopment --> reenvelopment pathway. *J Virol* **75**: 5697-702.
194. **Snyder A., Polcicova K. und Johnson D. C.** (2008) Herpes simplex virus gE/gI and US9 proteins promote transport of both capsids and virion glycoproteins in neuronal axons. *J Virol* **82**: 10613-24.
195. **Sodeik B., Ebersold M. W. und Helenius A.** (1997) Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J Cell Biol* **136**: 1007-21.
196. **Spear P. G., Eisenberg R. J. und Cohen G. H.** (2000) Three classes of cell surface receptors for alphaherpesvirus entry. *Virology* **275**: 1-8.
197. **Spear P. G. und Longnecker R.** (2003) Herpesvirus entry: an update. *J Virol* **77**: 10179-85.
198. **Spear P. G.** (2004) Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. *Cell Microbiol* **6**: 401-10.
199. **Stefanovic S. und Hegde R. S.** (2007) Identification of a targeting factor for posttranslational membrane protein insertion into the ER. *Cell* **128**: 1147-59.
200. **Stewart M.** (2007) Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 195-208.
201. **Stow N. D.** (1982) Localization of an origin of DNA replication within the TRS/IRS repeated region of the herpes simplex virus type 1 genome. *EMBO J* **1**: 863-7.
202. **Subramanian R. P. und Geraghty R. J.** (2007) Herpes simplex virus type 1 mediates fusion through a hemifusion intermediate by sequential activity of glycoproteins D, H, L, and B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 2903-8.
203. **Suetsugu S., Toyooka K. und Senju Y.** (2010) Subcellular membrane curvature mediated by the BAR domain superfamily proteins. *Semin Cell Dev Biol* **21**: 340-9.
204. **Sugimoto K., Uema M., Sagara H., Tanaka M., Sata T., Hashimoto Y. und Kawaguchi Y.** (2008) Simultaneous tracking of capsid, tegument, and envelope protein localization in living cells infected with triply fluorescent herpes simplex virus 1. *J Virol* **82**: 5198-211.
205. **Sullivan B. M. und Coscoy L.** (2010) The U24 protein from human herpesvirus 6 and 7 affects endocytic recycling. *J Virol* **84**: 1265-75.
206. **Suloway C. J., Chartron J. W., Zaslaver M. und Clemons W. M., Jr.** (2009) Model for eukaryotic tail-anchored protein binding based on the structure of Get3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 14849-54.
207. **Sun J., Zhao J., Schwartz M. A., Wang J. Y., Wiedmer T. und Sims P. J.** (2001) c-Abl tyrosine kinase binds and phosphorylates phospholipid scramblase 1. *J Biol Chem* **276**: 28984-90.
208. **Sun J., Nanjundan M., Pike L. J., Wiedmer T. und Sims P. J.** (2002) Plasma membrane phospholipid scramblase 1 is enriched in lipid rafts and interacts with the epidermal growth factor receptor. *Biochemistry* **41**: 6338-45.

209. **Taylor T. J., Brockman M. A., McNamee E. E. und Knipe D. M.** (2002) Herpes simplex virus. *Front Biosci* **7**: d752-64.
210. **Taylor T. J. und Knipe D. M.** (2004) Proteomics of herpes simplex virus replication compartments: association of cellular DNA replication, repair, recombination, and chromatin remodeling proteins with ICP8. *J Virol* **78**: 5856-66.
211. **Thurlow J. K., Murphy M., Stow N. D. und Preston V. G.** (2006) Herpes simplex virus type 1 DNA-packaging protein UL17 is required for efficient binding of UL25 to capsids. *J Virol* **80**: 2118-26.
212. **Trus B. L., Newcomb W. W., Cheng N., Cardone G., Marekov L., Homa F. L., Brown J. C. und Steven A. C.** (2007) Allosteric signaling and a nuclear exit strategy: binding of UL25/UL17 heterodimers to DNA-Filled HSV-1 capsids. *Mol Cell* **26**: 479-89.
213. **Turcotte S., Letellier J. und Lippe R.** (2005) Herpes simplex virus type 1 capsids transit by the trans-Golgi network, where viral glycoproteins accumulate independently of capsid egress. *J Virol* **79**: 8847-60.
214. **Uetz P., Dong Y. A., Zeretzke C., Atzler C., Baiker A., Berger B., Rajagopala S. V., Roupelieva M., Rose D., Fossum E. und Haas J.** (2006) Herpesviral protein networks and their interaction with the human proteome. *Science* **311**: 239-42.
215. **van Genderen I. L., Brandimarti R., Torrisi M. R., Campadelli G. und van Meer G.** (1994) The phospholipid composition of extracellular herpes simplex virions differs from that of host cell nuclei. *Virology* **200**: 831-6.
216. **Vasu S. K. und Forbes D. J.** (2001) Nuclear pores and nuclear assembly. *Curr Opin Cell Biol* **13**: 363-75.
217. **Vilardi F., Lorenz H. und Dobberstein B.** (2011) WRB is the receptor for TRC40/Asna1-mediated insertion of tail-anchored proteins into the ER membrane. *J Cell Sci* **124**: 1301-7.
218. **Vittone V., Diefenbach E., Triffett D., Douglas M. W., Cunningham A. L. und Diefenbach R. J.** (2005) Determination of interactions between tegument proteins of herpes simplex virus type 1. *J Virol* **79**: 9566-71.
219. **Vrabec J. T. und Alford R. L.** (2004) Quantitative analysis of herpes simplex virus in cranial nerve ganglia. *J Neurovirol* **10**: 216-22.
220. **Wadsworth S., Jacob R. J. und Roizman B.** (1975) Anatomy of herpes simplex virus DNA. II. Size, composition, and arrangement of inverted terminal repetitions. *J Virol* **15**: 1487-97.
221. **Wang F., Brown E. C., Mak G., Zhuang J. und Denic V.** (2010) A chaperone cascade sorts proteins for posttranslational membrane insertion into the endoplasmic reticulum. *Mol Cell* **40**: 159-71.
222. **Warming S., Costantino N., Court D. L., Jenkins N. A. und Copeland N. G.** (2005) Simple and highly efficient BAC recombineering using galK selection. *Nucleic Acids Res* **33**: e36.
223. **Weir J. P.** (2001) Regulation of herpes simplex virus gene expression. *Gene* **271**: 117-30.
224. **Wheeler M. A. und Ellis J. A.** (2008) Molecular signatures of Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Biochem Soc Trans* **36**: 1354-8.
225. **Wiedmer T., Zhou Q., Kwoh D. Y. und Sims P. J.** (2000) Identification of three new members of the phospholipid scramblase gene family. *Biochim Biophys Acta* **1467**: 244-53.
226. **Wiedmer T., Zhao J., Nanjundan M. und Sims P. J.** (2003) Palmitoylation of phospholipid scramblase 1 controls its distribution between nucleus and plasma membrane. *Biochemistry* **42**: 1227-33.
227. **Wild P., Engels M., Senn C., Tobler K., Ziegler U., Schraner E. M., Loepfe E., Ackermann M., Mueller M. und Walther P.** (2005) Impairment of nuclear pores in bovine herpesvirus 1-infected MDBK cells. *J Virol* **79**: 1071-83.
228. **Wills E., Mou F. und Baines J. D.** (2009) The U(L)31 and U(L)34 gene products of herpes simplex virus 1 are required for optimal localization of viral glycoproteins D and M to the inner nuclear membranes of infected cells. *J Virol* **83**: 4800-9.
229. **Wisner T. W., Wright C. C., Kato A., Kawaguchi Y., Mou F., Baines J. D., Roller R. J. und Johnson D. C.** (2009) Herpesvirus gB-induced fusion between the virion envelope and outer nuclear membrane during virus egress is regulated by the viral US3 kinase. *J Virol* **83**: 3115-26.
230. **Yamauchi Y., Shiba C., Goshima F., Nawa A., Murata T. und Nishiyama Y.** (2001) Herpes simplex virus type 2 UL34 protein requires UL31 protein for its relocation to the internal nuclear membrane in transfected cells. *J Gen Virol* **82**: 1423-8.
231. **Yang K., Homa F. und Baines J. D.** (2007) Putative terminase subunits of herpes simplex virus 1 form a complex in the cytoplasm and interact with portal protein in the nucleus. *J Virol* **81**: 6419-33.

232. **Yang K. und Baines J. D.** (2011) Selection of HSV capsids for envelopment involves interaction between capsid surface components pUL31, pUL17, and pUL25. *Proc Natl Acad Sci U S A*
233. **Zhou Q., Zhao J., Stout J. G., Luhm R. A., Wiedmer T. und Sims P. J.** (1997) Molecular cloning of human plasma membrane phospholipid scramblase. A protein mediating transbilayer movement of plasma membrane phospholipids. *J Biol Chem* **272**: 18240-4.
234. **Zhou Q., Sims P. J. und Wiedmer T.** (1998) Identity of a conserved motif in phospholipid scramblase that is required for Ca²⁺-accelerated transbilayer movement of membrane phospholipids. *Biochemistry* **37**: 2356-60.
235. **Zhou Q., Zhao J., Al-Zoghaibi F., Zhou A., Wiedmer T., Silverman R. H. und Sims P. J.** (2000) Transcriptional control of the human plasma membrane phospholipid scramblase 1 gene is mediated by interferon-alpha. *Blood* **95**: 2593-9.
236. **Zhou Q., Ben-Efraim I., Bigcas J. L., Junqueira D., Wiedmer T. und Sims P. J.** (2005) Phospholipid scramblase 1 binds to the promoter region of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor type 1 gene to enhance its expression. *J Biol Chem* **280**: 35062-8.
237. **Zhou Z. H., Chen D. H., Jakana J., Rixon F. J. und Chiu W.** (1999) Visualization of tegument-capsid interactions and DNA in intact herpes simplex virus type 1 virions. *J Virol* **73**: 3210-8.
238. **Zhu H. Y., Yamada H., Jiang Y. M., Yamada M. und Nishiyama Y.** (1999) Intracellular localization of the UL31 protein of herpes simplex virus type 2. *Arch Virol* **144**: 1923-35.

7. ANHANG

7.1. Abkürzungsverzeichnis

3-AT	3-Aminotriazol
°C	Grad Celsius
% (v/v)	Volumenprozent (<i>volume per volume</i>)
% (w/v)	Gewichtsprozent (<i>weight per volume</i>)
A	Ampère
Abb.	Abbildung
AD	Aktivierungsdomäne
APS	Ammoniumpersulfat
As.	Aminosäure
Asna1	<i>Arsenical pump-driving ATPase</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
BD	DNA-bindende Domäne
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bp	Basenpaar
Cam	Chloramphenicol
Cam ^R	Chloramphenicol-Resistenz
cDNA	<i>copyDNA</i>
cNLS	klassisches Kernlokalisierungssignal (<i>classical nuclear localisation signal</i>)
CPE	zytopathischer Effekt (<i>cytopathic effect</i>)
CR	konservierte Region (<i>conserved region</i>)
C-terminal	carboxyterminal
ctrl-	Kontroll- (<i>control-</i>)
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	dominant-negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DOG	2-Deoxy-Galaktose
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein Barr-Virus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EYFP	<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>
F	Farad
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
for	<i>forward</i>
g	Gramm
x g	Vielfaches der mittleren Erdbeschleunigung ($g = 9,81 \text{ m/s}^2$)

<i>galK</i>	Galaktokinase K
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
gk	<i>galK</i> -kann (Galaktokinase K-Kanamycin)
gX	Glykoprotein X
h	Stunde
h.p.i.	Stunden nach Infektion (<i>hours post infection</i>)
h.p.t.	Stunden nach Transfektion (<i>hours post transfection</i>)
HBSS	<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>
HCMV	humanes Cytomegalovirus
Hela	Henrietta Lacks
HHV	humanes Herpesvirus
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HSV	Herpes simplex-Virus
HVEM	<i>Herpesvirus Entry Mediator</i>
ICP	<i>infected cell protein</i>
ID	Interaktionsdomäne
IgG	Immunglobulin G
INF	Interferon
INM	innere Kernmembran (<i>inner nuclear membrane</i>)
IP3	Inositoltriphosphat
Kan	Kanamycin
Kan ^R	Kanamycin-Resistenz
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
KSHV	Kaposi-Sarkom assoziiertes Herpesvirus
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LUMIER	<i>luminescence based mammalian Interactome mapping</i>
μ	Micro
m	Milli
M	Molar, Mol pro Liter
MCMV	murines Cytomegalovirus
MEM	<i>Minimum Essential Media</i>
MGC	<i>mammalian gene collection</i>
min	Minute
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger-RNA</i>)
mt	Mutante
n	Nano
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäuren (<i>nonessential amino acids</i>)
NEC	Kernauswanderungskomplex (<i>nuclear egress complex</i>)
NES	Kernexportsignal
NFκB	<i>nuclear factor kappa-B</i>
NLS	Kernlokalisierungssignal (<i>nuclear localisation signal</i>)
nm	Nanometer
NPC	Kernporenkomplexe (<i>nuclear pore complex</i>)

N-terminal	aminoterminal
Ω	Ohm
OD	optische Dichte
ONM	äußere Kernmembran (<i>outer nuclear membrane</i>)
Orf	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
ori	Replikationsursprung (<i>origin of replication</i>)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pfu	<i>plaque forming unit</i>
PKC	Proteinkinase C
PL	Phospholipid
PLSCR	Phospholipid Scramblase
PrV	Pseudorabies Virus
qPCR	quantitative PCR
rev	<i>reverse</i>
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RSC	<i>rabbit skin cells</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SH3	<i>Src homology 3</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor</i>
SRP	<i>signal recognition particle</i>
SV40	<i>Simian Virus 40</i>
TA	<i>tail anchor</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TMD	Transmembrandomäne
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRC	<i>transmembrane domain recognition complex</i>
Tris	Tris(-hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit (<i>unit</i>)
UL	langes HSV-1 Gensegment (<i>unique long</i>)
US	kurzes HSV-1 Gensegment (<i>unique short</i>)
UV	ultraviolett
VHS	<i>virus host shutoff</i>
VL	Volle-Länge (Protein)

VP	Virion-Protein
VZV	Varizella Zoster-Virus
wt	Wildtyp
Y2H	Hefe-2-Hybridsystem (<i>Yeast-2-Hybrid</i>)
YPD	Hefeextrakt (Yeast extract) / Pepton / Dextrose

7.2. Publikationen und Präsentationen

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Januar 2008 bis September 2011 am Max von Pettenkofer-Institut, LMU München angefertigt. Teilergebnisse dieser Arbeit sind bzw. werden in folgenden wissenschaftlichen Beiträgen veröffentlicht:

Publikationen:

Melanie Ott, Georg Tascher, Sarah Haßdenteufel, Richard Zimmermann, Jürgen Haas, Susanne M. Bailer (2011) „Functional characterization of the essential tail-anchor of the HSV-1 nuclear egress protein pUL34.“ Journal of General Virology, Aug 10. [Epub ahead of print]

Melanie Ott*, Verena Raschbichler*, Claus-Henning Nagel, Beate Sodeik, Jürgen Haas, Susanne M. Bailer „A conserved NLS within the HSV-1 UL31 variable region required early and late in infection.“ In Vorbereitung

* geteilte Erstautorenschaft

Melanie Ott, Jürgen Haas, Susanne M. Bailer „Asna1 - a host factor required for efficient release of infectious HSV-1 virions.“ In Vorbereitung

Weitere Publikationen im Promotionszeitraum, die nicht in der Arbeit enthalten sind:

Hannah Striebinger, Jie Zhang, **Melanie Ott**, Johanne Duron, Zsolt Ruzsics, Jürgen Haas, Roger Lippé, Susanne M. Bailer „Subcellular trafficking and functional importance of Herpes simplex virus 1 Glycoprotein M domains.“ Journal of General Virology, eingereicht

Posterpräsentation:

Melanie Ott, Georg Tascher, Claus-Henning Nagel, Beate Sodeik, Jürgen Haas, Zsolt Ruzsics, Ulrich Koszinowski, Susanne M. Bailer „Requirements of the HSV-1 UL34 tail-anchor for membrane insertion, nuclear localization and viral function.“ 4th European Congress of Virology, Cernobbio, 07. - 11. April 2010

Melanie Ott, Jürgen Haas, Susanne M. Bailer „Tail-anchor protein biogenesis during Herpes simplex virus 1 infection.“ 21. Jahrestagung der GfV, Freiburg, 23. – 26. März 2011

7.3. Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei all denen bedanken, die auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Klaus Förstemann für die freundliche Übernahme der Vertretung dieser Arbeit an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der LMU München. Auch bei Prof. Dr. Roland Beckmann, PD Dr. Manfred Ogris, Prof. Dr. Karl-Peter Hopfner und Prof. Dr. Mario Halic bedanke ich mich für ihre Bereitschaft, die Promotionskommission zu bilden.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Susanne Bailer für die Bereitstellung des interessanten Themas, für die stets hervorragende Unterstützung und Betreuung dieser Arbeit sowie für die zahlreichen wertvollen Anregungen und Diskussionen, die maßgeblich zum Vollenden dieser Arbeit beitrugen. Auch für die kritische Durchsicht dieses Manuskriptes möchte ich mich herzlich bedanken.

Prof. Dr. Dr. Jürgen Haas danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe am Max von Pettenkofer-Institut der LMU München durchzuführen.

Bei Prof. Dr. Beate Sodeik möchte ich mich für die Überlassung der HSV-1 BACs, sowie bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Ulrich Koszinowski, vor allem bei Dr. Zsolt Ruzsics und Sigrid Seelmeir, für ihre ausgiebige Unterstützung auf dem Gebiet der BAC Mutagenese bedanken.

Für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen möchte ich mich bei Prof. Dr. Dr. Thomas C. Mettenleiter, Dr. Barbara Klupp und Dr. Harald Granzow vom Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems bedanken.

Besonders danke ich meinen Laborkollegen und allen Kollegen am Max von Pettenkofer-Institut, insbesondere den Mädels Hannah, Julia und Verena sowie Rudi, Marcus und allen übrigen Mitgliedern der „AG Spaß“ für die gegenseitige Unterstützung in allen Gemütslagen und den vielen lustigen Momenten, auch außerhalb des Labors. Der Laboralltag wäre ohne Euch nur halb so schön gewesen.

Mein tiefer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen lieben Eltern und dem Ben, die immer an mich geglaubt, mich bestärkt und in jeder Hinsicht unterstützt haben und mir damit so vieles erst ermöglicht haben. Danke für einfach alles!

