

**Aus dem Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische  
Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Lehrstuhl: Virologie

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. Ulrich Koszinowski

# **Membran-assoziierte Protein-Protein-Interaktionen des Herpes simplex-Virus 1**

DISSERTATION

zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften

an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München



vorgelegt von

**Hannah Viktoria Friedericke Striebinger**

aus Heidelberg

**2011**

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München.

**Betreuerin:** Priv. Doz. Dr. rer. nat. Susanne M. Bailer

**Zweitgutachter/in:** Prof. Dr. Peter Nelson, Ph.D.

**Dekan:** Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

**Tag der mündlichen Prüfung:** 16.07.2012

*Für Ellen und Wolfgang*

„Wenn man eine Katze auseinandernehmen will, um zu sehen, wie sie funktioniert,  
hat man als erstes eine nicht funktionierende Katze in den Händen.“

Douglas Adams

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Membran-assoziierte Protein-Protein-Interaktionen des Herpes simplex-Virus 1	1
1.2	Membrane-associated protein-protein-interactions of Herpes simplex virus-1	2
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>4</b>
2.1	Die Familie der Herpesviren	4
2.2	Das Herpes simplex-Virus 1 (HSV-1)	5
2.2.1	Aufbau und Struktur des Viruspartikels	6
2.2.2	Die Virusreplikation	7
2.2.3	Herpesvirale Membranproteine	14
2.2.3.1	Glykoprotein M (gM)	19
2.3	Funktionelle Genomik: Interaktionsnetzwerke des HSV-1	21
2.3.1	Intravirale Interaktionen	22
2.3.2	Virus-Wirt Interaktionen	24
2.3.2.1	Die zelluläre ESCRT-Maschinerie	24
2.4	Zielsetzung der Arbeit	28
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>30</b>
3.1	Material	30
3.1.1	Laborgeräte und Software	30
3.1.2	Verbrauchsmaterialien	31
3.1.3	Chemikalien	32
3.1.4	Enzyme, Molekulargewichtsstandards und Kits	33
3.1.5	Antikörper und Seren	34
3.1.5.1	Primäre Antikörper	34
3.1.5.2	Sekundäre Antikörper	34
3.1.6	Oligonukleotide	35
3.1.6.1	Oligonukleotide für die Rekombinationsklonierung	35
3.1.6.2	Oligonukleotide für klassische Klonierungen	36
3.1.6.3	Oligonukleotide für die zielgerichtete Mutagenese	36
3.1.6.4	Oligonukleotide für die BAC-Mutagenese	36
3.1.6.5	Oligonukleotide für die Quantifizierung von HSV-1 Genomkopien	37
3.1.7	Plasmide	37
3.1.7.1	Gateway-kompatible Leervektoren	37
3.1.7.2	HSV-1 Kollektion	38
3.1.7.3	Sonstige Plasmide	41
3.2	Organismen, Säugerezelllinien und Virusstämme	46
3.2.1	Bakterienstämme ( <i>Escherichia coli</i> )	46
3.2.2	Hefestämme ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	46
3.2.3	Säugerezelllinien	47
3.2.4	Virusstämme	47

<b>3.3</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>47</b>
3.3.1	Bakterienkultur ( <i>Escherichia coli</i> ) .....	47
3.3.1.1	Kultivierung und Nährmedien.....	47
3.3.1.2	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien .....	48
3.3.1.3	Transformation chemisch kompetenter Bakterien.....	48
3.3.1.4	Herstellung elektro- und rekombinationskompetenter SW102-Bakterien .....	49
3.3.2	Hefekultur ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) .....	49
3.3.2.1	Kultivierung und Nährmedien.....	49
3.3.2.2	Herstellung chemisch kompetenter Hefezellen.....	50
3.3.2.3	Transformation chemisch kompetenter Hefezellen .....	50
3.3.3	Gewebekultur von Säugerzellen.....	50
3.3.3.1	Kultivierung und Kryo-Konservierung .....	50
3.3.3.2	DNA-Transfektion .....	51
3.3.4	Virologische Methoden .....	51
3.3.4.1	Vermehrung der Virusstämme .....	51
3.3.4.2	HSV-1-Infektion von Säugerzellen.....	51
3.3.4.3	Plaque-Assay zur Bestimmung des Virustiters.....	51
3.3.4.4	Kinetik der HSV-1 Replikation ( <i>one-step growth kinetics</i> ) .....	52
3.3.4.5	Realtime PCR-Quantifizierung von HSV-1 Genomkopien mittels <i>TaqMan</i> <sup>TM</sup> -PCR (qRT-PCR).....	52
3.3.4.6	BAC-Mutagenese .....	53
3.3.5	Molekularbiologische Methoden .....	56
3.3.5.1	Plasmid-DNA-Isolierung aus <i>E. coli</i> -Bakterien (Mini-Präparation).....	56
3.3.5.2	BAC-DNA-Isolierung aus <i>E. coli</i> -Bakterien.....	56
3.3.5.3	Bestimmung der DNA-Konzentration .....	56
3.3.5.4	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	57
3.3.5.5	Horizontale Agarose-Gelelektrophorese .....	57
3.3.5.6	Klonierung mittels homologer Rekombination (Gateway-Klonierung) .....	57
3.3.5.7	DNA-Restriktionsverdau .....	58
3.3.5.8	Ligation von DNA-Fragmenten.....	59
3.3.5.9	Sequenzierung von DNA .....	59
3.3.5.10	Zielgerichtete Mutagenese .....	59
3.3.6	Biochemische Methoden.....	59
3.3.6.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot.....	59
3.3.7	Methoden zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen.....	61
3.3.7.1	Hefe-2-Hybridsystem ( <i>Yeast-2-Hybrid</i> , Y2H).....	61
3.3.7.1.1	Das Hefe-2-Hybridsystem im Hochdurchsatz: Matrix-basierte Y2H-Screens .....	62
3.3.7.2	BRET-Assay ( <i>bioluminescence resonance energy transfer</i> ).....	63
3.3.8	Mikroskopische Methoden.....	64
3.3.8.1	Indirekte Immunfluoreszenz (IF).....	64
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>65</b>
<b>4.1</b>	<b>Erweiterung des intraviralen Proteininteraktionsnetzwerkes von HSV-1 .....</b>	<b>65</b>
4.1.1	Identifizierung neuer intraviraler Proteininteraktionen mittels Matrix-basiertem Hefe-2-Hybridsystem .....	65
4.1.2	Das Interaktionsnetzwerk der HSV-1 Membranproteine .....	70
4.1.3	Das BRET-System als Validierungsmöglichkeit für Protein-Protein-Interaktionen von Membranproteinen .....	73
4.1.4	Integration der Interaktionsdaten der HSV-1 Membranproteine in das bestehende intravirale Netzwerk.....	77

4.1.5	Das intravirale Interaktom im physiologischen Kontext.....	79
<b>4.2</b>	<b>Glykoprotein M: Funktionelle Charakterisierung der cytoplasmatisch exponierten Domäne .....</b>	<b>81</b>
4.2.1	Der Transport von HSV-1 gM zu TGN-Membranen geschieht unabhängig von <i>trafficking</i> - Motiven der C-terminalen Domäne.....	81
4.2.2	HSV-1 gM bildet keine Homooligomere .....	84
4.2.3	BAC-Mutagenese von UL10 (gM) .....	85
4.2.4	Die Mutante HSV-1 gMΔC zeigt einen inhibitorischen Phänotyp.....	87
4.2.5	Im viralen Kontext verbleibt gMΔC im ER.....	88
4.2.6	Die Lokalisierung viraler Glykoproteine wird durch die Deletion der cytoplasmatischen Domäne von gM nicht beeinflusst .....	90
4.2.7	Die Deletion der C-terminalen Domäne von gM reduziert die Effizienz der HSV-1 Replikation .....	90
<b>4.3</b>	<b>Interaktionen der zellulären ESCRT-Maschinerie mit HSV-1.....</b>	<b>92</b>
4.3.1	Test der ESCRT-Proteine auf Autoaktivierung (Hefe-2-Hybridsystem).....	93
4.3.2	Identifizierung von Virus-Wirt Proteininteraktionen mittels Matrix-basiertem Hefe-2- Hybridsystem .....	94
4.3.3	Interaktionsnetzwerk der ESCRT-Komponenten mit HSV-1 Proteinen .....	97
4.3.4	Das ESCRT-HSV-1 Netzwerk im physiologischen Kontext.....	99
4.3.5	Kombination der intraviralen Proteininteraktionen mit dem Virus-Wirt-Netzwerk .....	101
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>103</b>
<b>5.1</b>	<b>Kritische Beurteilung des Hefe-2-Hybridsystems (Y2H) im Hochdurchsatzverfahren .....</b>	<b>103</b>
5.1.1	Die Verwendung von Membranproteinen im Y2H-System .....	105
<b>5.2</b>	<b>Intravirale Interaktionen der HSV-1 Membranproteine .....</b>	<b>107</b>
<b>5.3</b>	<b>Das BRET-System als Validierungsmöglichkeit von Y2H-Daten.....</b>	<b>114</b>
<b>5.4</b>	<b>Subzelluläres <i>trafficking</i> und funktionale Bedeutung der Domänen von Glykoprotein M (gM) .....</b>	<b>117</b>
<b>5.5</b>	<b>Die zelluläre ESCRT-Maschinerie als Knospungshilfe für HSV-1 .....</b>	<b>123</b>
<b>6</b>	<b>REFERENZEN .....</b>	<b>128</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>142</b>
<b>7.1</b>	<b>Das HSV-1 Proteom .....</b>	<b>142</b>
<b>7.2</b>	<b>Y2H-Daten für intravirale Netzwerke.....</b>	<b>145</b>
7.2.1	Das intravirale Netzwerk der HSV-1 Membranproteine.....	145
7.2.2	Das erweiterte HSV-1 Interaktom/im Kontext des reifen Viruspartikels .....	146
<b>7.3</b>	<b>Y2H-Daten der Virus-Wirt-Interaktionen .....</b>	<b>148</b>
7.3.1	Interaktionen von ESCRT- und HSV-1 Proteinen/im Kontext des reifen Viruspartikels .....	148
<b>7.4</b>	<b>Abkürzungen .....</b>	<b>150</b>
<b>7.5</b>	<b>Publikationen und Kongressbeiträge .....</b>	<b>154</b>
<b>7.6</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>155</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Virionstruktur und Genomaufbau des Herpes simplex-Virus 1 .....	7
Abbildung 2.2: Der herpesvirale Replikationszyklus .....	8
Abbildung 2.3: Orientierung von Membranproteinen .....	16
Abbildung 2.4: Potenzielle Topologie von HSV-1 gM .....	20
Abbildung 2.5: Topologie von Interaktionsnetzwerken .....	23
Abbildung 2.6: Molekularer Mechanismus der MVB Biogenese.....	27
Abbildung 3.1: Prinzip der BAC-Mutagenese .....	54
Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Gateway-Klonierung .....	58
Abbildung 3.3: Das Hefe-2-Hybridsystem (Y2H).....	61
Abbildung 3.4: Hefe-2-Hybridsystem im Hochdurchsatz (Y2H <i>Direct Mating</i> ) .....	63
Abbildung 4.1: Auswertungsbeispiel des Matrix-basierten Y2H-Screens .....	67
Abbildung 4.2: Intravirales Interaktionsnetzwerk der HSV-1 Membranproteine.....	72
Abbildung 4.3: Das BRET-System.....	74
Abbildung 4.4: Modifizierung der BRET-Vektoren .....	75
Abbildung 4.5: HSV-1 pUL45 bildet Homooligomere .....	77
Abbildung 4.6: Das Interaktom von HSV-1 .....	78
Abbildung 4.7: Das HSV-1 Interaktom im physiologischen Kontext.....	80
Abbildung 4.8: Subzelluläre Lokalisierung von HA-gM und HA-gMΔC.....	82
Abbildung 4.9: Subzelluläre Lokalisierung von gM-Mutanten .....	83
Abbildung 4.10: HSV-1 gM bildet keine Homooligomere .....	85
Abbildung 4.11: Herstellung von HSV-1 gM-Mutanten.....	86
Abbildung 4.12: HSV-1 gMΔC zeigt einen inhibitorischen Phänotyp .....	88
Abbildung 4.13: Im viralen Kontext verbleibt gMΔC im ER.....	89
Abbildung 4.14: Subzelluläre Verteilung viraler Glykoproteine im Kontext von HSV-1 Mutanten.....	90
Abbildung 4.15: Replikationskinetik der HSV-1 Mutanten.....	91
Abbildung 4.16: Test der ESCRT-Fusionsproteine auf Autoaktivierung des Y2H-Reportersystems.....	94
Abbildung 4.17: Virus-Wirt Interaktom von HSV-1 und der zellulären ESCRT-Maschinerie .....	98
Abbildung 4.18: Virus-Wirt-Interaktom im physiologischen Kontext .....	100
Abbildung 4.19: Modell der sekundären Umhüllung von HSV-1 .....	102
Abbildung 5.1: Schnittmenge der PPI von HSV-1 Membranproteinen .....	107

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Membranproteine des HSV-1 .....	18
Tabelle 2.2: ESCRT-Untereinheiten und assoziierte Proteine (nach Hurley und Hanson, 2010) .....	25
Tabelle 3.1: Primärantikörper .....	34
Tabelle 3.2: Sekundärantikörper .....	34
Tabelle 3.3: Oligonukleotide für die Rekombinationsklonierung.....	35
Tabelle 3.4: Oligonukleotide für klassische Klonierungen .....	36
Tabelle 3.5: Oligonukleotide für die zielgerichtete Mutagenese .....	36
Tabelle 3.6: Oligonukleotide für die BAC-Mutagenese .....	36
Tabelle 3.7: Oligonukleotide für die Quantifizierung von HSV-1 Genomkopien.....	37
Tabelle 3.8: Gateway-kompatible Leervektoren .....	37
Tabelle 3.9: HSV-1 Kollektion .....	38
Tabelle 3.10: Sonstige Plasmide .....	41
Tabelle 3.11: Verwendete Bakterienstämme.....	46
Tabelle 3.12: Verwendete Hefestämme.....	46
Tabelle 3.13: Verwendete Säugerzelllinien .....	47
Tabelle 3.14: Verwendete Virusstämme .....	47
Tabelle 4.1: HSV-1 Membranproteinfragmente.....	66
Tabelle 4.2: Mittels Y2H-Analyse detektierte Proteininteraktionen der HSV-1 Membranproteinfragmente.....	69
Tabelle 4.3: Für Y2H-Screens verwendete ESCRT-Proteine.....	93
Tabelle 4.4: Y2H Interaktionen zwischen ESCRT- und HSV-1 Proteinen .....	95
Tabelle 7.1: Das HSV-1 Proteom.....	142
Tabelle 7.2: Das intravirale Netzwerk der HSV-1 Membranproteine .....	145
Tabelle 7.3: Das erweiterte HSV-1 Interaktom/im Kontext des reifen Viruspartikels .....	146
Tabelle 7.4: Interaktionen von ESCRT- und HSV-1 Proteinen/im Kontext des reifen Viruspartikels ..	148

# 1 ZUSAMMENFASSUNG

## 1.1 Membran-assoziierte Protein-Protein-Interaktionen des Herpes simplex-Virus 1

Herpesviren umfassen eine große Gruppe von human- sowie tierpathogenen Erregern. Auf Grund ihrer hohen Durchseuchungsrate und Fähigkeit zur Etablierung einer latenten Infektion stellen humane Herpesviren vor allem für immunsupprimierte Patienten eine ernsthafte Bedrohung dar. Deshalb ist eine umfassende Aufklärung des viralen Replikationszyklus für die Entwicklung von antiviralen Therapiestrategien zwingend erforderlich. Besonders die membran-assoziierten Vorgänge der Virionmorphogenese - primäre Umhüllung an der inneren Kernmembran mit darauffolgendem Verlust der Virushülle an der äußeren Kernmembran sowie sekundäre Umhüllung an cytoplasmatischen Membranen - sind nur unvollständig entschlüsselt. Um das komplexe Zusammenspiel der viralen Proteine während des Replikationszyklus an den verschiedenen zellulären Membranen aufzudecken, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine genomweite Analyse der Protein-Protein-Interaktion (PPI) der durch Herpes simplex-Virus 1 (HSV-1) kodierten Membranproteine durchgeführt. Außerdem lieferte die Identifizierung von PPI zwischen dem HSV-1 Proteom und Untereinheiten der zellulären ESCRT-Maschinerie (*endosomal sorting complex required for transport*) weitere Belege für die Ausbeutung von Wirtsfaktoren durch das Virus zur Knospung der Partikel. Zur Detektion der genomweiten PPI sowohl intraviral als auch zwischen Virus und Wirt wurde das Hefe-2-Hybridsystem (Y2H) im Hochdurchsatz angewandt. Beide Datensätze konnten eine Vielzahl neuer PPI aufdecken und somit eine solide Grundlage für Interaktionsnetzwerke und zukünftige funktionale Studien schaffen. Auch wurde durch das breite Interaktionsspektrum des Virus mit den z.T. funktionell redundanten ESCRT-Proteinen erneut veranschaulicht, wie die Nutzung flexibler Strategien zur Stabilität des HSV-1 beiträgt.

Anhand der Y2H-Analysen wurde ein virales Membranprotein als interessanter Kandidat zur funktionalen Charakterisierung ausgewählt. Glykoprotein M (gM/UL10) von HSV-1 ist ein Typ-III Transmembranprotein, das während der Infektion in verschiedenen Membrankompartimenten lokalisiert. Obwohl evolutionär konserviert, ist es zumindest für HSV-1 nicht-essenziell und seine molekulare Funktion unklar. Auch die funktionale Relevanz einiger potenzieller *trafficking* Motive von gM ist noch nicht aufgeklärt. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass das *targeting* von gM zum *trans*-Golgi Netzwerk (TGN) unabhängig von anderen viralen Faktoren sowie seinen potenziellen C-terminalen *trafficking* Motiven erfolgt und keiner Homooligomerisierung bedarf.

Erstaunlicherweise führt die Deletion der C-terminalen Domäne von gM (gM $\Delta$ C) zu seiner Retention im ER, wohingegen der Vorwärtstransport durch eine kurze, nicht-verwandte Sequenz wiederhergestellt wurde. Demzufolge enthält die C-terminale Domäne von gM wahrscheinlich keine Sequenzinformation für das *targeting* vom ER zum Golgi-Apparat, jedoch scheint die Faltung und Integrität des Proteins dafür von Bedeutung zu sein.

Im Kontext der Virusinfektion führte die Deletion der C-terminalen Domäne von gM (HSV-1 gM $\Delta$ C) zur Akkumulation von nicht-umhüllten Partikeln im Cytoplasma, verminderter Freisetzung von Viruspartikeln und in ihrer Infektiosität beeinträchtigten reifen Virionen. Alle Effekte wurden durch eine Revertante wieder aufgehoben und sind demnach spezifisch. Im Gegensatz dazu zeigten zwei zusätzliche Mutanten, HSV-1  $\Delta$ gM mit einem frühzeitigen Stoppcodon an Position 3 von UL10 und gM $\Delta$ ac ohne potenzielle *trafficking* Motive, Wildtyp-ähnliche Wachstumskinetiken. Daraus lässt sich schließen, dass zwar gM entbehrlich ist, gM $\Delta$ C jedoch einen dominant-negativen Effekt ausübt. Daher wird eine Beteiligung der N-terminalen Bereiche von gM (Aminosäuren 1-361) an der Rekrutierung von viralen und/oder zellulären Faktoren zum Ort der sekundären Umhüllung postuliert. Diese Daten enthüllen neue unbekannte Eigenschaften von HSV-1 gM.

## **1.2 Membrane-associated protein-protein-interactions of Herpes simplex virus-1**

Herpesviruses comprise a large group of pathogens infecting both humans and animals. Due to their high frequency of infection and ability to establish latent infections, human herpesviruses are a serious threat especially for immunosuppressed patients. Therefore, the comprehensive understanding of the herpesviral replication cycle is mandatory for the development of antiviral therapeutic strategies. The membrane-associated steps in virion morphogenesis, such as primary envelopment and subsequent loss of this envelope at both nuclear leaflets as well as secondary envelopment at cytoplasmic membranes, are of particular interest as only partially elucidated. To reveal the complex interplay of viral proteins during replication at diverse cellular membranes, a genome-wide analysis of protein-protein-interactions (PPI) regarding membrane proteins encoded by Herpes simplex virus-1 (HSV-1) was carried out in this study. In addition, identification of PPI among HSV-1 proteome and subunits of the cellular ESCRT-machinery (*endosomal sorting complex required for transport*) provided further evidence for viral hijacking of host factors to perform viral budding. In order to detect both genome-wide intraviral as well as virus-host PPI, the yeast-2-hybrid-system (Y2H) was applied in a high-throughput fashion. Either dataset uncovered a multitude of new PPI, serving as a solid foundation for interaction networks and future functional studies. Also, the broad

spectrum of viral interactions with ESCRT-proteins that are to some extent of functional redundancy illustrates once again how the use of flexible strategies contributes to the stability of HSV-1.

On the basis of this Y2H-analysis, a viral membrane protein was selected as interesting candidate for functional characterisation. Glycoprotein M (gM/UL10) of HSV-1 is a type-III transmembrane protein reported to be present at various membrane compartments during infection. Although evolutionarily conserved, HSV-1 gM is non-essential and its molecular function unclear. Also the functional relevance of several potential trafficking motifs encoded by gM has yet to be elucidated. This study could show that targeting of gM to the *trans*-Golgi network (TGN) occurs independent of other viral factors, of the potential C-terminal trafficking motifs, and does not involve homo-oligomerization. Surprisingly, deletion of the C-terminal domain of gM (gM $\Delta$ C) caused its ER retention, whereas forward transport was rescued by a short unrelated tail. Hence, the C-terminal domain of gM is unlikely to contain sequence information for ER to TGN targeting, but protein folding and integrity seem to be of importance.

In the context of viral infection, the deletion of the C-terminal domain of gM (HSV-1 gM $\Delta$ C) led to accumulation of unenveloped cytoplasmic particles, reduced egress of viral particles and mature virions compromised in infectivity. These effects were specific, as not observed for the revertant virus strain. On the contrary, two additional viral mutants, HSV-1  $\Delta$ gM carrying a premature stop codon at position 3 of the UL10 gene as well as the gM $\Delta$ ac virus missing all predicted trafficking motifs, displayed wildtype-like growth kinetics. In conclusion, gM is fully dispensable but gM $\Delta$ C exhibits a dominant effect. Thus, a role for the N-terminal domains of gM (residues 1-361) in the recruitment of viral and/or cellular components to the site of final envelopment is postulated. These data elucidate novel unknown characteristics of HSV-1 gM.

## 2 EINLEITUNG

### 2.1 Die Familie der Herpesviren

Die Familie der Herpesviren (*Herpesviridae*) gehört zur Ordnung der *Herpesvirales* und umfasst über hundert Vertreter (Davison *et al.*, 2009). Zur Replikation nutzen sie verschiedene Wirbeltierarten als Wirtsorganismen, darunter auch den Menschen sowie viele seiner Nutz- und Haustiere, und verursachen dadurch diverse Krankheitsbilder. Um neue Wege der Infektionsbekämpfung zu erschließen, ist die Erforschung der Herpesviren von besonderem Interesse.

Herpesviren sind sehr große Viren mit einem Durchmesser von 150 bis 200 nm und verfügen über ein lineares, doppelsträngiges DNA-Genom. Dieses liegt verpackt in einem ikosaedrischen Capsid vor, welches wiederum von einer Proteinschicht (Tegument) und einer von der Wirtszelle stammenden Lipidmembran (*envelope*) umhüllt wird (Modrow *et al.*, 2010). Der Eintritt der Viruspartikel in die Zelle erfolgt über Fusionsereignisse der viralen mit der zellulären Membran. Im Zellkern findet anschließend die Transkription und Replikation der viralen DNA unter Beteiligung einiger viral kodierter Enzyme statt, während die Expression der viralen Gene vom zellulären Proteinbiosynthese-Apparat gewährleistet wird. Die Bildung neuer Capside und ihre Beladung mit viraler DNA verläuft im Nukleoplasma, im Cytoplasma werden die Virionen abschließend prozessiert (Pellett und Roizman, 2007). Der herpesvirale Replikationszyklus ist ein lytischer Zyklus, d.h. die Wirtszellen sterben nach der Freisetzung neuer Nachkommenviren ab. Ein herausragendes Merkmal der Herpesviren ist ihre Fähigkeit zur Etablierung einer latenten Infektion. Dabei werden sie durch das Immunsystem nicht vollständig aus dem Körper des Wirtes entfernt, sondern verbleiben dort lebenslang. In der Latenzphase liegt ihr Genom in bestimmten Zelltypen in einer geringen Kopienzahl vor, von hier kann eine Reaktivierung in den lytischen Infektionszustand auftreten.

Die verschiedenen Spezies gleichen sich zwar in ihrer Morphologie und ihren biologischen Eigenschaften, verursachen jedoch sehr unterschiedliche Symptome. Auf Grund ihrer Pathogenität und anderer Faktoren, wie der Dauer der Replikation sowie dem bevorzugt infizierten Zelltyp, werden Herpesviren in drei Unterfamilien unterteilt. Bis heute wurden acht humanpathogene Herpesviren (HHV) identifiziert. Zur Familie der  $\alpha$ -Herpesviren gehören die Herpes simplex-Viren 1 und 2 (HSV-1 und HSV-2) sowie das Varicella Zoster-Virus (VZV). Die Infektion mit Simplex-Viren führt zur typischen Hautbläschenbildung an den Lippen (*Herpes labialis*) oder im Genitalbereich (*Herpes genitalis*), während VZV der Erreger von Windpocken und Gürtelrose ist. Die  $\alpha$ -Herpesviren zeichnen sich durch eine zumindest *in vitro* sehr schnelle Replikation und ein breites Spektrum an

Wirtszelltypen aus, die latente Infektion wird in Nervenzellen etabliert. Die Roseoloviren HHV-6 und HHV-7 sowie das humane Cytomegalovirus (hCMV) gehören zu den  $\beta$ -Herpesviren, die einen vergleichsweise langsamen Replikationszyklus und ein enges Wirtszellspektrum besitzen. Während die Infektion mit hCMV bei gesunden Menschen harmlos verläuft, stellt sie bei immunsupprimierten Patienten oder während einer Schwangerschaft eine ernsthafte Bedrohung dar. Die letzte Unterfamilie, die sogenannten  $\gamma$ -Herpesviren, verfügt ebenfalls über ein sehr enges Wirtszellspektrum, ist aber in der Dauer ihrer Replikationszyklen heterogen. Die humanpathogenen Vertreter Epstein Barr-Virus (EBV) und das Kaposi-Sarkom-assoziierte Herpesvirus (KSHV) sind Verursacher von verschiedenen Tumorerkrankungen und überdauern die Latenzphase typischerweise in B-Zellen (Modrow *et al.*, 2010).

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

Das Herpes simplex-Virus 1 (HSV-1) ist ein weltweit sehr häufig vorkommendes Humanpathogen, die Durchseuchungsrate beträgt bei Erwachsenen ca. 90%. Die Primärinfektion erfolgt meist im Kindesalter in den Epithelzellen des oro-facialen Bereichs und verläuft häufig inapparent. Das Virus vermehrt sich lytisch, bei einer symptomatischen Infektion kommt es dabei zur Bildung der typischen Läsionen an Lippen oder Mundschleimhaut (*Herpes labialis*), die eine hohe Konzentration infektiöser Partikel enthalten. Die Übertragung des Virus erfolgt über physikalischen Kontakt mit den Hautbläschen oder dem Speichel infizierter Personen, kann jedoch auch über asymptomatische Träger stattfinden, die nur geringe Mengen infektiöser Partikel ausscheiden. Die Latenz der HSV-1 Infektion wird durch das Einwandern von Virionen über Zell-Zell-Kontakte (Johnson und Huber, 2002) in nahe gelegene Nervenendigungen und somit in die Zellen der dazugehörigen Ganglien (üblicherweise Trigemini- und Ciliarganglion) etabliert. In der Latenzphase liegt das virale Genom extrachromosomal als zirkuläres Episom in stabiler Kopienzahl in den Nervenzellen vor. Die Reaktivierung des lytischen Infektionszyklus erfolgt in unregelmäßigen Abständen und wird häufig durch Umwelteinflüsse wie z.B. UV-Strahlung oder Stress induziert. Dabei werden Viruspartikel aktiv entlang des Axons zur Hautoberfläche transportiert (Diefenbach *et al.*, 2008), wo eine erneute Infektion der Epithelzellen stattfindet. Als Komplikationen einer HSV-1 Infektion können Virionen in das Auge oder seltener in das Gehirn gelangen und dort eine Entzündung auslösen (*Herpes cornea* bzw. Meningitis/Encephalitis). Besonders problematisch ist die Reaktivierung von Herpesviren bei immunsupprimierten Patienten, durch HSV-1 können Entzündungen der Leber, Speiseröhre oder Haut, aber vor allem der Lunge ausgelöst werden. Zur Therapie einer HSV-1 Infektion wird das Nucleosidderivat Aciclovir verwendet, das von viralen Enzymen zur DNA-Synthese verwendet wird und zum Strangabbruch während der Replikation führt. Da die zelluläre DNA-Replikation nicht

betroffen ist, besitzt Aciclovir eine hohe Selektivität mit geringen Nebenwirkungen. Die latente Infektion durch HSV-1 kann allerdings nicht medikamentös verhindert werden.

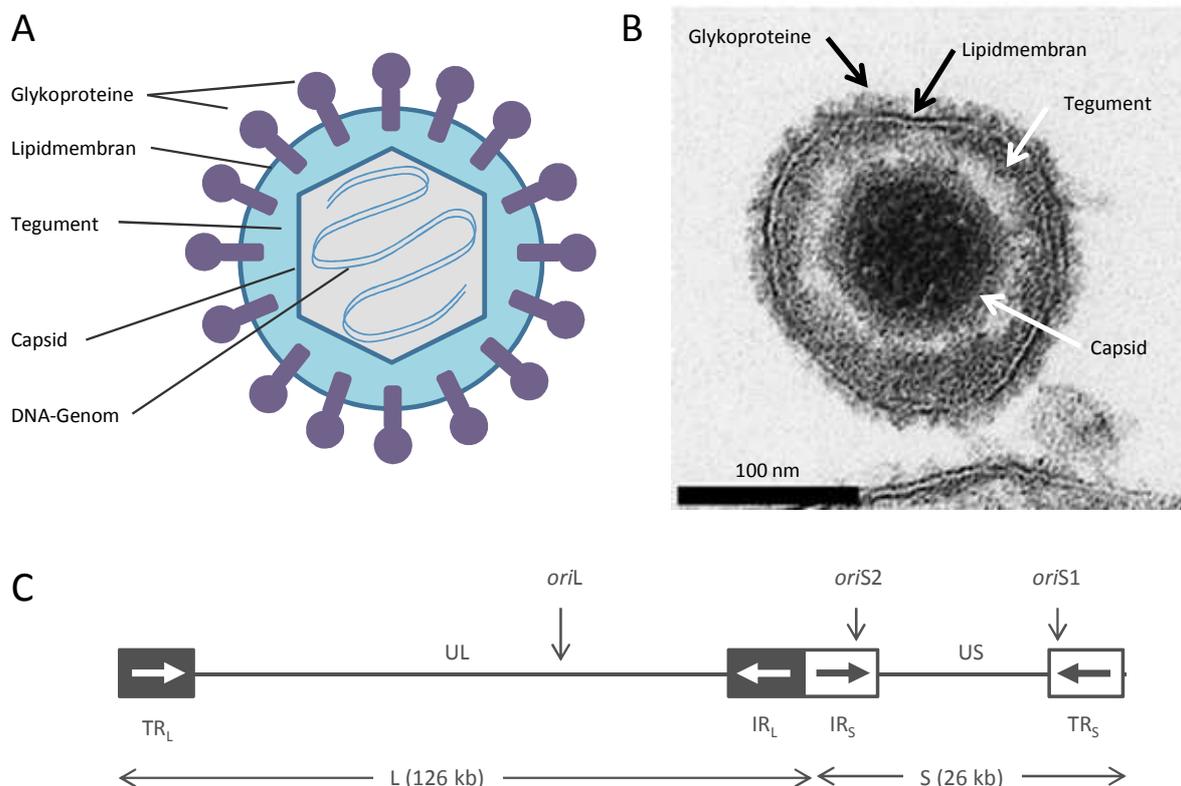
### 2.2.1 Aufbau und Struktur des Viruspartikels

Das HSV-1 Virion ist, wie alle Herpesviren, aus vier im Elektronenmikroskop unterscheidbaren Strukturen aufgebaut (siehe Abbildung 2.1) und besitzt einen Durchmesser von 170 bis 200 nm (Grunewald *et al.*, 2003). Im Zentrum des Partikels befindet sich das lineare doppelsträngige DNA-Genom, das dicht gepackt in einem flüssig-kristallinen Zustand vorliegt (Booy *et al.*, 1991). Umgeben wird es von einem 125 nm großen Capsid von ikosaedrischer Symmetrie, das aus 162 Untereinheiten, den sogenannten Capsomeren aufgebaut ist. Von diesen besitzen 150 eine hexamere und 12 eine pentamere Struktur, die wiederum durch Triplexen miteinander verbunden werden. Die Capsomere werden aus dem Hauptcapsidprotein pUL19 (VP5) und pUL35 (VP26) gebildet, während die Triplexstrukturen aus einer Kopie pUL38 (VP19C) und zwei Kopien pUL18 (VP23) aufgebaut sind (Zhou *et al.*, 2000). Zwölf Kopien des Genprodukts von UL6 bilden ein ringförmiges Portal, durch das die DNA eingeschleust wird (Newcomb *et al.*, 2001). Das mit DNA beladene Capsid (Nukleocapsid) ist mit einer von der Wirtszelle stammenden Lipidmembran (*envelope*) nach außen abgegrenzt. Die genaue Zahl von viral kodierten Membranproteinen, die in diese Hüllmembran inseriert sind, ist nach wie vor nicht abschließend geklärt. Eine massenspektrometrische Analyse reifer HSV-1 Partikel konnte die Anwesenheit von neun der zwölf viral kodierten Glykoproteine bestätigen, ebenso das Vorkommen von vier weiteren Transmembranproteinen (Loret *et al.*, 2008). Zwischen Capsid und *envelope* befindet sich das Tegument, eine unstrukturierte Proteinmatrix aus mindestens 20 verschiedenen Viruskomponenten, die unterschiedlich groß sein kann, wodurch sich die Abweichungen im Durchmesser reifer Virionen erklären. Einigen der Tegumentproteine konnten regulatorische Funktionen in der frühen Phase des viralen Replikationszyklus zugeordnet werden (Modrow *et al.*, 2010).

Das HSV-1 Genom besitzt eine Größe von ca. 152 kb (McGeoch *et al.*, 1988) und ist in ein langes (L) und ein kurzes (S) Segment unterteilt (siehe Abbildung 2.1). Beide Segmente verfügen über einzigartig vorkommende Sequenzbereiche, die als *unique long* (UL) bzw. *unique short* (US) bezeichnet werden. Diese werden von sich wiederholenden Sequenzabfolgen, sogenannten *repeats*, flankiert. Je nach ihrer Lage im Genom werden sie als *terminal repeat* (TR) oder *internal repeat* (IR) bezeichnet. Die UL- und US-Bereiche können relativ zueinander invertiert vorliegen, so dass vier verschiedene lineare Isomere vorkommen, die sich weder in ihrem Informationsgehalt noch in ihrer Infektiosität unterscheiden (Modrow *et al.*, 2010). Das HSV-1 Genom enthält drei Bereiche, sogenannte *origins of replication* (*ori*), an denen die DNA-Replikation beginnen kann (Lehman und

Boehmer, 1999; Taylor *et al.*, 2002). Das *oriL* liegt dabei zentral in der UL-Region, während *oriS1* und *oriS2* in den flankierenden *repeats* der US-Sequenz zu finden sind. Zur erfolgreichen Replikation des HSV-1 Genoms muss lediglich eines der drei *ori*-Elemente vorhanden sein.

Das HSV-1 Genom kodiert für mindestens 84 Proteine sowie einige nicht-translatierte Transkripte (Rajcani *et al.*, 2004; Roizman *et al.*, 2007). Die Expression der viralen Proteine erfolgt kaskadenartig in drei aufeinanderfolgenden, hochregulierten Gruppen (Honess und Roizman, 1974), die an anderer Stelle genauer beschrieben werden. Zum Überblick ist in Anhang 7.1 die Gesamtheit der HSV-1 Proteine, das sogenannte Proteom dargestellt.



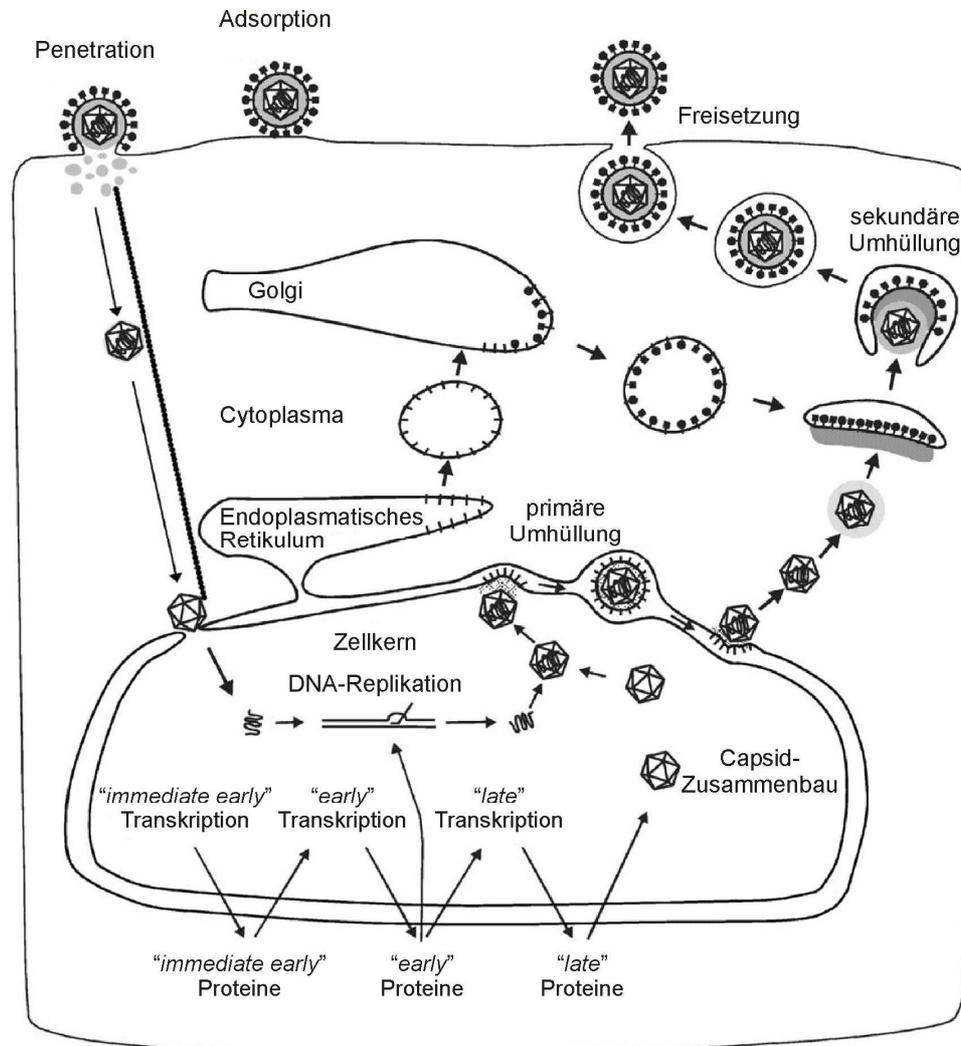
**Abbildung 2.1: Virionstruktur und Genomaufbau des Herpes simplex-Virus 1**

(A) Das ikosaedrische Capsid enthält das doppelsträngige DNA-Genom und ist umgeben von einer Proteinmatrix namens Tegument sowie einer vom Wirtsorganismus stammenden Lipidmembran mit viralen Glyko- und Transmembranproteinen (schematische Abbildung). (B) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines HSV-1 Partikels (modifiziert nach Mettenleiter *et al.*, 2009). (C) Schematische Darstellung des HSV-1 Genoms. Die Segmente mit einmalig vorkommender Sequenz (UL = *unique long*; US = *unique short*) werden von Einheiten mit sich wiederholenden Sequenzen flankiert (TR = *terminal repeat*; IR = *internal repeat*). Das Genom besitzt drei Replikationsursprünge (*ori* = *origin of replication*), an denen die DNA-Replikation beginnen kann (modifiziert nach Modrow *et al.*, 2010).

### 2.2.2 Die Virusreplikation

Da Viren selbst keinen Stoffwechsel besitzen, sind sie zur Bildung von Nachkommenviren auf die Infektion einer Wirtszelle und damit auf die Ausnutzung ihres Biosynthese-Apparats angewiesen. Die

Replikation von HSV-1 umfasst mehrere Schritte (siehe Abbildung 2.2), die teilweise bis heute noch nicht umfassend aufgeklärt sind. Die Zeitspanne, in der der Zyklus einmal vollständig abläuft, beträgt in permissiver Zellkultur ca. 18-20 Stunden (Roizman *et al.*, 2007).



**Abbildung 2.2: Der herpesvirale Replikationszyklus**

Der einzelnen Schritte des herpesviralen Lebenszyklus sind im Text beschrieben (modifiziert nach Mettenleiter, 2004).

Die Infektion einer Wirtszelle beginnt mit der Anlagerung von Viruspartikeln an die Zelloberfläche (**attachment/Adsorption**) und nachfolgender Aufnahme der Partikel in die Zelle (**entry/Penetration**) durch Membranfusionsereignisse. Beide Prozesse werden durch virale Glykoproteine der Virushülle und zelluläre Komponenten vermittelt (Campadelli-Fiume und Menotti, 2007). Der erste Schritt besteht in der Bindung des nicht-essenziellen Glykoproteins C (gC) an Proteoglykane der Zelloberfläche (Spear *et al.*, 1992), hauptsächlich Heparan- oder Chondroitinsulfat. Proteoglykane sind besonders stark glykosylierte Glykoproteine, die den Hauptbestandteil der tierischen

extrazellulären Matrix ausmachen. Dieser Schritt erleichtert zwar die Infektion der Wirtszelle, ist jedoch keine Voraussetzung für eine erfolgreiche Replikation (Gruenheid *et al.*, 1993). Vier weitere virale Glykoproteine – gD, das Heterodimer gH/gL und gB - werden für den *entry*-Mechanismus benötigt, bei dem Tegument und Capsid in die Zelle aufgenommen werden. Zunächst kommt es zur Bindung von Glykoprotein D (gD) an zelluläre Rezeptoren, mindestens drei Typen von gD-Rezeptoren konnten bisher identifiziert werden. Dazu gehören die interzellulären Adhäsionsmoleküle Nektin 1 und 2 (Cocchi *et al.*, 1998; Krummenacher *et al.*, 1999), der sogenannte *herpesvirus entry mediator* (HVEM), ein Mitglied der Tumor-Nekrosefaktor-Rezeptorfamilie (Montgomery *et al.*, 1996) sowie 3-O-sulfoniertes Heparansulfat (Shukla *et al.*, 1999). Das häufige Vorkommen von mindestens einem Rezeptortyp auf Zellen unterschiedlicher Gewebe sorgt für das recht breite Wirtsspektrum von HSV-1. Die Membranfusion wird durch fusogene Eigenschaften der essenziellen, konservierten Glykoproteine gH/gL sowie gB ausgelöst (Spear, 2004). Basierend auf aktuellen Forschungsergebnissen wurde folgendes Modell für den Virus-*entry* entwickelt (Maurer *et al.*, 2008): Die Rezeptorbindung von gD verursacht eine Konformationsänderung von gD (Cocchi *et al.*, 2004; Fusco *et al.*, 2005; Krummenacher *et al.*, 2005), die wiederum das Glykoproteinheterodimer gH/gL aktiviert. Dadurch werden virale und zelluläre Membran so nah zueinander gezogen, dass eine Vermischung der Lipide möglich wird (Atanasiu *et al.*, 2007; Avitabile *et al.*, 2007; Subramanian und Geraghty, 2007). Die Rekrutierung des trimeren Glykoproteins B durch gH/gL führt letztendlich zur Bildung und Erweiterung der Membranfusionspore, wodurch tegumentierte Capside in das Cytoplasma gelangen. Alternativ kann die Infektion auch über eine endocytotische Aufnahme von Viruspartikeln mit anschließender Membranfusion von Vesikel- und Virusmembran beginnen (Nicola und Straus, 2004; Clement *et al.*, 2006). Die Capside werden entlang der Mikrotubuli unter Verwendung des Motorproteins Dynein und seinem Cofaktor Dynactin und Beteiligung einiger Tegumentproteine zum Zellkern transportiert (Sodeik *et al.*, 1997; Wolfstein *et al.*, 2006). Nach Bindung der Capside an die Kernporen (Sodeik *et al.*, 1997) wird die virale DNA in das Nukleoplasma transloziert (Ojala *et al.*, 2000), wo sie zirkularisiert und als Episom vorliegt (Poffenberger und Roizman, 1985; Strang und Stow, 2005). Die Tegumentproteine werden je nach Funktion und Destination in der Zelle verteilt. Einige gelangen entweder mit dem Capsid oder Capsid-unabhängig in den Zellkern, während andere im Cytoplasma verbleiben (Kelly *et al.*, 2009).

Die nachfolgenden Ereignisse – virale DNA-Transkription und Replikation, die Bildung neuer Capside sowie deren Austritt aus dem Zellkern – setzen sowohl einen strukturellen Umbau des Zellkerns als auch die Inhibierung der zellulären Transkription und Translation voraus (Roizman *et al.*, 2007), die durch sehr komplexe und größtenteils unverstandene Prozesse absolviert werden. Die **virale Genexpression** beginnt ca. 2 bis 4 Stunden nach Infektion und lässt sich in drei kaskadenartig

regulierte Expressionsgruppen unterteilen (Hones und Roizman, 1974). Die Transkription der viralen Gene erfolgt durch die zelluläre RNA-Polymerase II (Costanzo *et al.*, 1977; Taylor *et al.*, 2002), wird jedoch durch virale Faktoren initiiert und reguliert. Auch der Export viraler mRNA erfolgt unter Beteiligung viraler Mechanismen, während die Translation vollständig vom zellulären Proteinsynthese-Apparat durchgeführt wird. Als Erstes werden  $\alpha$ -induziert durch das Tegumentprotein VP16 (pUL48) - die sechs Proteine der frühesten Expressionsgruppe transkribiert ( $\alpha$ /*immediate early*), die selbst größtenteils expressionsregulatorische Funktionen besitzen. Diese induzieren die Transkription der nächsten Expressionsgruppe ( $\beta$ /*early*), die funktional für die virale DNA-Replikation und den Nukleotid-Metabolismus sind. Sie fördern die Replikation des HSV-1 Genoms und stimulieren damit die Expression der dritten und letzten Gruppe ( $\gamma$ /*late*), die hauptsächlich virale Strukturproteine kodiert. Diese Gruppe bildet zwar ein Kontinuum, wird aber nochmals unterteilt in Proteine, die unabhängig von der viralen DNA-Replikation ( $\gamma_1$ /*leaky late*) bzw. erst nach deren Initiation ( $\gamma_2$ /*true late*) exprimiert werden (Roizman *et al.*, 2007). Zelluläre mRNA wird von viralen Faktoren wie z.B. dem sogenannten *virion host shut-off* (Vhs, pUL41) gezielt degradiert, um die bevorzugte Translation der viralen mRNA zu gewährleisten (Strom und Frenkel, 1987). Dies ist nur eine von vielen viralen Strategien, um die Kontrolle über die Wirtszelle zu erlangen. Neu-synthetisierte virale Proteine werden im Cytoplasma z.T. posttranslational modifiziert und die im Nukleoplasma benötigten Proteine werden in den Zellkern transportiert. Dies geschieht entweder über eigene Kernlokalisierungssignale (NLS) oder im Komplex mit Proteinen, die ein solches Signal kodieren.

Parallel zur Genexpression der  $\gamma$ -Proteine findet im Zellkern die **virale DNA-Replikation** statt. Dieser Prozess erfolgt in sogenannten Replikationskompartimenten (Quinlan *et al.*, 1984) unter Beteiligung von sowohl essenziellen als auch nicht-essenziellen viral kodierten Faktoren. Zunächst bindet das *origin binding protein* pUL9 an eines der drei *ori* im zirkularisierten HSV-1 Genom und initiiert mit Hilfe seiner Helikase-Aktivität die Entwindung des DNA-Stranges. Die dadurch entstehenden einzelsträngigen DNA-Bereiche werden durch das *single-stranded binding protein* ICP8 (pUL29) gebunden. Gemeinsam rekrutieren sie die restlichen fünf essenziellen Faktoren zur Replikationsgabel. Dabei besteht der virale DNA-Helikase-Primase-Komplex aus den drei Untereinheiten pUL5, pUL8 sowie pUL52, während die virale DNA-Polymerase pUL30 mit ihrem Prozessivitätsfaktor pUL42 dimerisiert. Die DNA-Synthese beginnt vermutlich mit dem Theta-Mechanismus, wechselt aber anschließend in den sogenannten *rolling circle*-Mechanismus über, wodurch lange DNA-Konkatamere produziert werden. Neben weiteren viralen Proteinen, die hauptsächlich Funktionen im Nukleotid-Metabolismus und der DNA-Modifikation besitzen, sind auch

zelluläre Faktoren, wie z.B. Topoisomerase oder DNA-Ligase an der Genom-Replikation beteiligt (Lehman und Boehmer, 1999).

Die **Bildung neuer Capside** (*capsid assembly*) findet ebenfalls im Zellkern statt. Die dazu benötigten Bausteine - die Capsidproteine pUL19 (VP5), pUL35 (VP26), pUL38 (VP19C), pUL18 (VP23), pUL6 sowie die Reifungsprotease pUL26 (VP24) und das *scaffolding protein* pUL26.5 (VP22a) - werden in den Zellkern transportiert. Dort wird ein Gerüst aus dem *scaffolding protein* (pUL26.5) und der Protease pUL26 gebildet, um das sich die Capsidproteine in der in 2.2.1 beschriebenen Zusammensetzung anlagern (Trus *et al.*, 1996). Beide Prozesse verlaufen autokatalytisch und finden in räumlicher Nähe zur DNA-Replikation in den Replikationskompartimenten statt (Church und Wilson, 1997; de Bruyn Kops *et al.*, 1998). Das Proteingerüst im Inneren des Capsids wird in einem Prozess namens **DNA-packaging** durch eine Einheit des HSV-1 Genoms ersetzt. Parallel zum proteolytischen Abbau des Capsidgerüsts durch die Reifungsprotease pUL26 wird die konkatamere virale DNA durch das aus pUL6 gebildete Portal in das Capsid eingeschleust und vermutlich beim Erreichen des maximalen Füllungsgrades geschnitten, so dass genau eine Genomeinheit eingelagert wird (Varmuza und Smiley, 1985; Newcomb *et al.*, 2001). An diesem Prozess sind einige z.T. konservierte virale Proteine beteiligt, darunter die drei Untereinheiten der Terminase pUL15, pUL28 und pUL33 (Wills *et al.*, 2006) sowie die Capsidproteine pUL17, pUL25 und pUL32 (Stow, 2001; Baines und Duffy, 2006; Cockrell *et al.*, 2009). Drei in ihrer Zusammensetzung verschiedene Typen von Capsiden können im Nukleus vorkommen. Alle besitzen den gleichen Durchmesser von 120 nm und die äußere Capsidhülle. Sogenannte C-Capside sind mit viraler DNA beladen und können zu infektiösen Partikeln reifen, während B-Capside im Innern ein Gerüst aus pUL26.5 und pUL26 besitzen und damit die Vorstufe zu reifen C-Capsiden bilden. A-Capside wiederum sind ungefüllt und resultieren vermutlich aus nicht erfolgreichen *packaging*-Versuchen (Roizman *et al.*, 2007).

Die mit DNA beladenen Nucleocapside müssen nun den Zellkern verlassen (**nuclear egress**), um zu infektiösen, umhüllten Virionen zu reifen. Für diesen Schritt werden drei Modelle diskutiert. Das *envelopment-deenvelopment*-Modell (Skepper *et al.*, 2001) postuliert einen ersten Umhüllungsschritt an der inneren Kernmembran (INM) gefolgt vom Verlust der ersten Membranhülle durch Fusionsereignisse an der äußeren Kernmembran (ONM). Dem luminalen Modell (Johnson und Spear, 1982) liegt ebenfalls eine Umhüllung an der INM zu Grunde, diese Hülle bleibt allerdings erhalten, während das umhüllte Virion über vesikulären Transport das ER (endoplasmatisches Retikulum) verlässt. Ein erst vor wenigen Jahren entwickeltes drittes Modell (Wild *et al.*, 2005; Wild *et al.*, 2009) postuliert den Austritt der Nucleocapside aus dem Zellkern über erweiterte Kernporen. Auf Grund zahlreicher biochemischer, genetischer und morphologischer Evidenzen gilt jedoch das **envelopment-deenvelopment-Modell** als das wahrscheinlichste (Remillard-Labrosse *et al.*, 2006; Mettenleiter *et*

*al.*, 2009) und soll hier genauer beschrieben werden. Die primäre Umhüllung von Nucleocapsiden an der INM - ein einzigartiger, herpesviruspezifischer Vorgang - wird als Membranknospungsereignis (*budding*) bezeichnet und geschieht in Abhängigkeit der beiden konservierten und essenziellen viralen Proteine pUL31 und pUL34, die zusammen den *nuclear egress complex* (NEC) bilden. Das von UL34 kodierte Protein ist ein *tail-anchor* Transmembranprotein, das posttranslational in das ER inseriert wird und lateral über die Kernporen in die INM gelangt (Shiba *et al.*, 2000). Im Nukleoplasma findet eine direkte Interaktion von pUL34 mit dem dort lokalisierten Phosphoprotein pUL31 statt, so dass sich beide Proteine gegenseitig an der INM verankern (Reynolds *et al.*, 2001). Gemeinsam bewirken sie ein Auflockern der nukleären Lamina, so dass die Nucleocapside Zugang zur INM erhalten. Dies wird durch Interaktionen mit den Kernlamina erreicht (Reynolds *et al.*, 2004; Simpson-Holley *et al.*, 2005; Mou *et al.*, 2008), aber auch durch die Rekrutierung der zellulären Proteinkinase C (Park und Baines, 2006) sowie der viralen Kinase pUS3 (Mou *et al.*, 2008), die durch Phosphorylierung der Kernlamina ein Auflösen des Laminnetzwerks bewirken. Der Mechanismus, der dem Knospungsereignis an der INM zu Grunde liegt, ist bis heute nicht aufgeklärt. Allerdings spielt in diesem Prozess der Proteinkomplex aus pUL34/pUL31 eine essenzielle Rolle (Roller *et al.*, 2000; Reynolds *et al.*, 2001), während die Proteinkinase pUS3 regulatorische Funktionen übernimmt (Reynolds *et al.*, 2002). Für den homologen NEC des Pseudorabiesvirus (PRV) - ebenfalls ein Mitglied der  $\alpha$ -Herpesviren - konnte gezeigt werden, dass pUL34/pUL31 unabhängig von anderen viralen Faktoren ausreichend ist, um die Bildung von Vesikeln an der INM zu induzieren (Klupp *et al.*, 2007). Außerdem werden beide Proteine zwar in perinukleäre Virionen, jedoch nicht in reife, extrazelluläre Viruspartikel inkorporiert (Reynolds *et al.*, 2002; Loret *et al.*, 2008). Die genaue Zusammensetzung dieser primär umhüllten Viren im perinukleären Raum hinsichtlich ihrer Tegument- und Glykoproteine ist nicht bekannt, auf Grund von elektronenmikroskopischen Analysen wird jedoch vermutet, dass sie sich strukturell von reifen Partikeln unterscheiden (Granzow *et al.*, 2001; Baines *et al.*, 2007). Neben pUL34 lokalisieren noch weitere virale Transmembranproteine an der INM bzw. in primär umhüllten Virionen, nämlich gM (UL10), gB (UL27), gH/gL (UL22/UL1) sowie gD (US6) (Torrissi *et al.*, 1992; Stannard *et al.*, 1996; Baines *et al.*, 2007; Farnsworth *et al.*, 2007). Studien mit HSV-1 Deletionsmutanten haben weiterhin gezeigt, dass zusätzlich zu pUL31 die beiden Tegumentproteine pUL11 und pUL37 an der primären Umhüllung beteiligt sind (Baines und Roizman, 1992; Desai *et al.*, 2001) ebenso wie das virale Glykoprotein K (UL53) (Jayachandra *et al.*, 1997). Das *envelopment-development*-Modell setzt nach diesem primären Umhüllungsschritt an der INM ein Membranfusionsereignis mit der ONM und damit den Verlust der primären Membranhülle voraus. Obwohl eine Fülle von Beobachtungen für dieses Modell sprechen (Campadelli-Fiume, 2007), sind die molekularen Grundlagen dieses Fusionsmechanismus bis heute unklar, was in den letzten Jahren zu

kontroversen Diskussionen geführt hat (Campadelli-Fiume und Roizman, 2006; Mettenleiter, 2006). Verschiedene Studien deuten auf eine Beteiligung der Glykoproteine B (UL27) und H (UL22) an diesem Fusionsprozess hin (Farnsworth *et al.*, 2007; Wisner *et al.*, 2009), die auch für die Membranfusion während des *Virus-entry* essenziell sind. Allerdings konnte dies für die Proteinhomologen des PRV nicht bestätigt werden (Klupp *et al.*, 2008).

Nach dem Austritt der Nukleocapside aus dem Zellkern muss die Tegumentierung abgeschlossen und die finale Membranhülle im Cytoplasma erworben werden. Auch dieser Schritt im HSV-1 Lebenszyklus ist weitgehend unverstanden, auch weil daran beteiligte Proteine redundante Funktionen besitzen. Man nimmt an, dass über Protein-Protein-Interaktionen zunächst eine innere und anschließend eine äußere Tegumentschicht an das Capsid angelagert werden, die wiederum in Wechselwirkung mit den cytoplasmatischen Domänen der viralen Glykoproteine den Kontakt zu Golgi-Membranen herstellen, so dass die **sekundäre Umhüllung** (*secondary envelopment*) stattfinden kann (Kelly *et al.*, 2009; Mettenleiter *et al.*, 2009). Proteine des inneren Teguments sind neben der Proteinkinase pUS3 auch pUL36 (ICP1/2) und pUL37, die zumindest bei HSV-1 bereits im Zellkern an die Nukleocapside angelagert werden (Bucks *et al.*, 2007). Das pUL36 wird über die Interaktion mit dem Capsidprotein pUL25 rekrutiert (Coller *et al.*, 2007) und sorgt anschließend für die Aufnahme von pUL37 (Vittone *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2008). Die Verbindung des inneren mit dem äußeren Tegument scheint über das genregulatorische pUL48 (VP16) vermittelt zu werden (Mossman *et al.*, 2000). Als Bestandteil der äußeren Tegumentschicht sorgt der hypothetische Komplex aus dem membranassoziierten pUL11, pUL16 und pUL21 (Klupp *et al.*, 2005; Yeh *et al.*, 2008) für die Verankerung des Teguments mit der Hüllmembran (Farnsworth *et al.*, 2007). Intrazellulärer Transport der tegumentierten Capside erfolgt über Kinesin-abhängigen Transport entlang der Mikrotubuli (Lyman und Enquist, 2009). Als Ort der sekundären Umhüllung konnten Vesikel des *trans*-Golgi Netzwerks (TGN) identifiziert werden (Turcotte *et al.*, 2005; Sugimoto *et al.*, 2008), auch wenn eine Beteiligung der Endosomen oder des *multivesicular body* nicht ausgeschlossen ist. Die Anbindung von tegumentierten Capsiden an Membranen des TGN scheint über Wechselwirkungen der cytoplasmatisch exponierten Domänen einiger viraler Glykoproteine mit Tegumentproteinen vermittelt zu werden. Dadurch wird die Bildung von Membraneinstülpungen – das sogenannte *budding* – gefördert, so dass sekundär umhüllte Viren entstehen, die in zellulären Vesikeln lokalisieren (Mettenleiter, 2004). An diesem Prozess sind gD (US6) und der Komplex aus gE/gI (US8/US7) beteiligt, und zwar in redundanter Art und Weise (Farnsworth *et al.*, 2003; Farnsworth *et al.*, 2007). Das Glykoprotein M (UL10) scheint ebenfalls involviert zu sein (Brack *et al.*, 1999; Crump *et al.*, 2004) und seit kurzem wird auch eine Funktion des Fusionsproteins gB (UL27) während des *secondary envelopment* diskutiert (Johnson *et al.*, 2011). Der Mechanismus dieser auswärts

gerichteten Membranknospenbildung ist nicht geklärt, könnte jedoch mit der Bildung intraluminarer Vesikel am Endosom verwandt sein (siehe 2.3.2.1). Die neu gebildeten, reifen Viren verlassen die Wirtszelle nun auf exozytotischem Weg (**egress**). Die Vesikel, die die umhüllten Viruspartikel enthalten, fusionieren mit der Cytoplasmamembran und setzen so die Nachkommenviren frei. Über die Beteiligung von viralen Proteinen an diesem Prozess ist wenig bekannt. Ein Komplex aus den beiden Transmembranproteinen gK (UL53) und pUL20 (Foster *et al.*, 2008) könnte daran beteiligt sein (Mettenleiter, 2004), neuere Studien weisen jedoch eher auf eine Rolle dieser Proteine vor oder während des *secondary envelopments* hin (Melancon *et al.*, 2005; Fulmer *et al.*, 2007).

Alternativ zur Exozytose kann die Virusausbreitung von der infizierten Wirtszelle auch über Zell-Zellkontakte direkt zu benachbarten Zellen erfolgen, ein Prozess der als **cell-to-cell spread** bezeichnet wird (Campadelli-Fiume, 2007). Daran sind die für den Virus *entry* benötigten Glykoproteine (gD, gH/gL und gB) sowie das Heterodimer aus gE/gI (US8/US7) beteiligt. Der Komplex aus gE/gI ermöglicht den Übertritt von Viruspartikeln entlang der Zell-Zellkontakte, indem es intrazellulären Sortiermechanismen signalisiert, neu gebildete Nachkommenviren zur basolateralen, mit Zell-Zellkontakten angereicherten Membranseite von z.B. Epithelzellen zu transportieren (Johnson *et al.*, 2001). Andererseits fördert es speziell die sekundäre Umhüllung an solchen Vesikeln, die zum Transport zur basalen Membran bestimmt sind (Johnson und Huber, 2002). Diese Form der Virusverbreitung findet *in vivo* sowohl bei der Ausbreitung der Infektion von Epithel- zu Nervenzellen als auch bei der Reaktivierung einer latenten Infektion statt. Dieser Mechanismus wird als Strategie zur Immunevasion betrachtet, da das Virus so vor neutralisierenden Antikörpern und Zellen des Immunsystems geschützt wird.

### 2.2.3 Herpesvirale Membranproteine

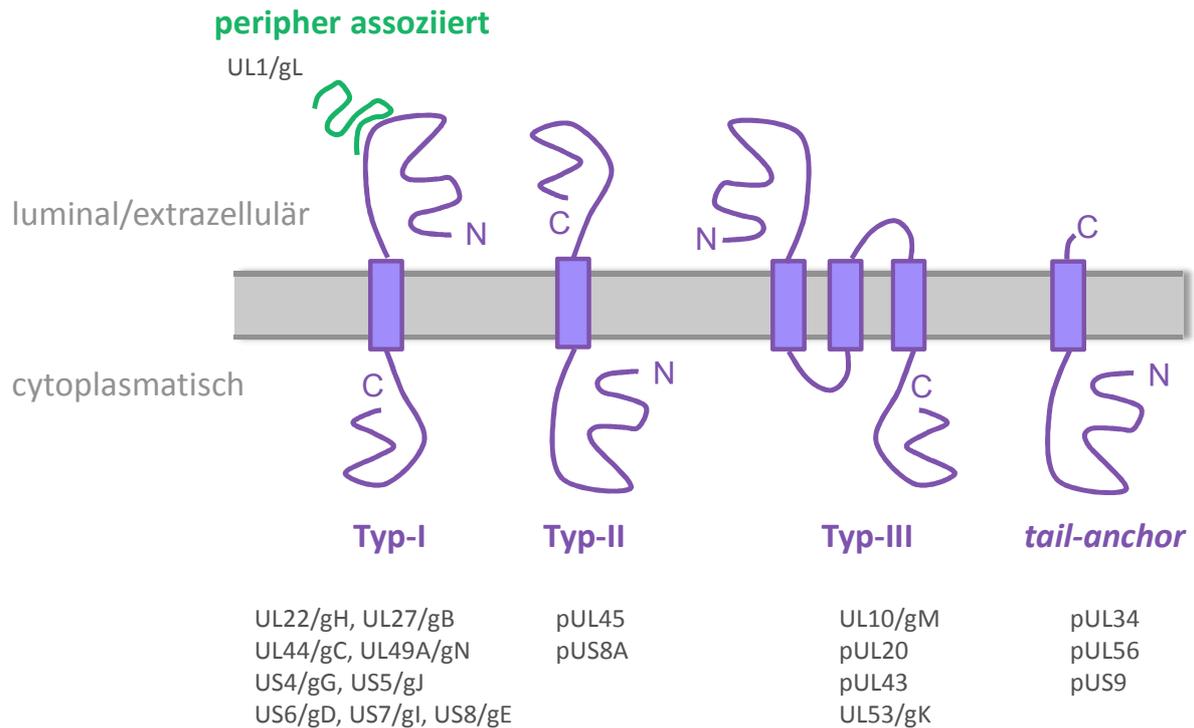
Zelluläre Membranproteine sind für eine Fülle von Funktionen unentbehrlich. So sind sie u.a. beteiligt am Membrantransport verschiedenster Moleküle, an Signaltransduktionsprozessen, an der Regulation von intrazellulärem Vesikeltransport oder an der Positionierung von Proteinen an spezifischen zellulären Strukturen. Auch Herpesviren kodieren Membranproteine, die bei verschiedenen Stadien des Replikationszyklus eine Rolle spielen. Die Funktionen, die sie dabei übernehmen, sind jedoch nur teilweise aufgeklärt. Ihre Synthese erfolgt analog zu den zellulären Membranproteinen und auch strukturell gibt es keine Unterschiede.

Membranproteine durchqueren die hydrophobe Lipiddoppelschicht zellulärer Membranen in einer Breite von ca. 50 Å, und für diese Membrandomänen sind zwei Strukturen bekannt. Das sogenannte  $\beta$ -barrel kommt nur in bestimmten Organellen oder gram-negativen Bakterien vor, während Membrandomänen mit  $\alpha$ -helikaler Struktur deutlich häufiger und in allen zellulären Membranen

auftreten. Auch alle vorhergesagten herpesviralen Membranproteine besitzen eine solche Struktur. Dabei verbinden eine oder mehrere hydrophobe  $\alpha$ -Helices die wasserlöslichen Domänen des Proteins auf beiden Seiten der Membran. Eine solche  $\alpha$ -Helix besteht hauptsächlich aus hydrophoben (apolaren) Aminosäuren, die nach außen orientiert sind und mit den Membranlipiden in Wechselwirkung stehen. Dazwischen gibt es auch hydrophile (polare) und neutrale Aminosäuren, die in das Innere der Helix gerichtet sind. An beiden Enden der Helix - auf gleicher Höhe mit den Kopfgruppen der Lipide - sind zwei normalerweise eher selten vorkommende aromatische Aminosäuren (Tryptophan und Tyrosin) angereichert. Häufig enthalten die auf cytoplasmatischer Seite exponierten Proteindomänen mehr positiv geladene Aminosäuren als die auf der luminalen/extrazellulären Seite (von Heijne, 2007). Über diese Eigenschaften lassen sich sowohl die Position der Membrandomänen als auch die wahrscheinlichste Topologie der dazugehörigen Proteine mit Computerprogrammen recht zuverlässig vorhersagen (z.B. CBS TMHMM Server v. 2.0; <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>).

Die hydrophoben Domänen der Membranproteine würden zur Aggregatbildung im Cytoplasma führen, wenn sie wie lösliche Proteine an freien Ribosomen synthetisiert werden würden. Daher haben sich zelluläre Mechanismen entwickelt, um ein naszierendes Membranprotein zu erkennen, zu binden und es der Ziellmembran zuzuführen. Der am besten charakterisierte Mechanismus ist das SRP-Sec61 System, das für die cotranslationale Integration von Membranproteinen in das ER eukaryotischer Zellen sorgt (Alder und Johnson, 2004; Rapoport *et al.*, 2004). Das *signal recognition particle* (SRP) erkennt und bindet die erste hydrophobe Domäne, die das Ribosom während der Translation verlässt. Dabei kann es sich um die erste Membrandomäne oder aber um ein Signalpeptid handeln. Gleichzeitig bindet das SRP an das Ribosom und verursacht einen temporären Stopp der Translation. Anschließend assoziiert dieser Komplex mit der ER-Membran über die Bindung an den SRP-Rezeptor und das SRP wird freigesetzt, worauf die Bindung des Ribosoms an den Sec61-Komplex in der ER-Membran erfolgt. Dadurch öffnet sich die wässrige Pore des Sec61-Komplexes und die naszierende Polypeptidkette kann eingefädelt werden. Die einsetzende Elongation schiebt das naszierende Protein in das ER-Lumen, wo die Bindung an Chaperone ebenfalls eine gewisse Zugkraft ausübt. Befindet sich ein ausreichend apolares Segment im Sec61-Kanal, wird es lateral in die Membran entlassen und damit inseriert.

Grundsätzlich unterscheidet man fünf Typen von Membranproteinen (siehe Abbildung 2.3), die sich in ihrer Orientierung bzw. Anzahl an Membrandomänen unterscheiden (Pollard *et al.*, 2007). Typ-I Transmembranproteine besitzen ein hydrophobes Signalpeptid, das die Translokation initiiert und nach erfolgreicher Membraninsertion durch die Signalpeptidase abgespalten wird. Das Auftauchen der zukünftigen Transmembrandomäne (TM-Domäne) im Translokation-Kanal dient als Stoppsignal für



**Abbildung 2.3: Orientierung von Membranproteinen**

Typ-I und Typ-II Membranproteine besitzen jeweils nur eine Transmembrandomäne (TM-Domäne), sind jedoch in gegensätzlicher Orientierung in der Membran inseriert. Membranproteine mit multiplen TM-Domänen (Typ-III) können in jeglicher Orientierung vorliegen. Peripher assoziierte Membranproteine besitzen keine TM-Domäne, werden aber durch die Bindung an Membranproteine oder Phospholipide mit der Membran assoziiert. Sogenannte *tail-anchor* Proteine werden posttranslational in die Membran inseriert, ihre TM-Domäne befindet sich am äußersten C-Terminus, wobei der N-Terminus immer cytoplasmatisch exponiert ist. Die 19 potenziellen HSV-1 Membranproteine sind zur besseren Übersicht ihrem jeweiligen Topologietyp zugeordnet.

die Translokation, so dass der N-Terminus luminal exponiert vorliegt. Bei Membranproteinen vom Typ-II dient die TM-Domäne als interne Signalsequenz und Startsignal für die Translokation, so dass der C-Terminus in das ER-Lumen transloziert wird. Membranproteine mit mehreren TM-Domänen (Typ-III) nutzen auch das Sec61-Translokon zur Membraninsertion, wie sie dabei die korrekte Topologie erhalten, ist jedoch noch wenig verstanden (Sadlish *et al.*, 2005). Der N- und C-Terminus dieser Proteine kann je nach Anzahl der TM-Domänen und Topologie natürlich verschieden exponiert sein. Auch peripher assoziierte Membranproteine, die zwar selbst keine TM-Domäne besitzen, aber durch Interaktionen mit anderen Membranproteinen oder Phospholipiden mit der Membran assoziiert sind, können zu den Membranproteinen gezählt werden. Schließlich gibt es noch eine Klasse von Membranproteinen, die posttranslational in das ER inseriert werden, sogenannte *tail-anchor* Proteine. Sie besitzen eine Transmembrandomäne am äußersten C-Terminus und sind immer mit dem N-Terminus zur cytoplasmatischen Seite orientiert. Die Mechanismen, die sie zur Membraninsertion nutzen, sind teilweise noch unklar und äußerst komplex (Rabu *et al.*, 2009).

Fast alle am rauen ER synthetisierten Proteine - sowohl die löslichen als auch Membranproteine - werden im ER-Lumen glykosyliert. Dabei wird ein bereits vorgeformtes Oligosaccharid üblicherweise auf eine Aminogruppe in der Seitenkette eines Asparagins transferiert, weshalb dieser Prozess als N-Glykosylierung bezeichnet wird. Dieses Vorläufer-Oligosaccharid wird bereits im ER und später im Golgi-Apparat modifiziert, so dass reife Glykoproteine mit einer Vielfalt an Oligosacchariden ausgestattet sind (Lodish *et al.*, 2000). Die am ER synthetisierten und inserierten Membranproteine verbleiben je nach Funktion entweder im ER oder werden zum Golgi-Apparat und evtl. von dort weiter transportiert. Die Lokalisierung am ER wird durch *retrieval*- und Retentionssignale gewährleistet (Ellgaard und Helenius, 2003), während zu transportierende Proteine meist über Sortiersignale verfügen. Da die Membran des ER ein Kontinuum mit den Kernmembranen bildet, können Membranproteine auch in die Kernmembranen gelangen und dort über Interaktionen lokalisiert werden. Lösliche und Membranproteine, die nicht ER-resident sind, werden an sogenannten *exit sites* konzentriert und verlassen mit Hilfe von COPII-Vesikeln (*coatamer protein II*) das ER in Richtung Golgi-Apparat. Der zelluläre Golgi-Apparat dient als Transport- und Sortierstation nicht nur für Proteine, sondern auch für Lipide (Wilson *et al.*, 2010). Die Cargoproteine durchqueren den Golgi-Apparat vollständig von der *cis*- zur *trans*-Seite, und werden dabei abschließend prozessiert. Modifikationen der bereits im ER angefügten Oligosaccharide sowie die O-Glykosylierung, bei der Zuckermoleküle an die Hydroxygruppe von Serin oder Threonin angehängt werden, finden hier statt und dienen der Proteinreifung. Am *trans*-Golgi Netzwerk (TGN) werden die Proteine entsprechend ihrer Destination in verschiedene Transportvesikel verpackt und so ihrer Zielmembran zugeführt (De Matteis und Luini, 2008). Der Proteintransport erfolgt entweder über spezifische Sortiersignale oder alternativ werden Proteine ohne Transportsequenzen in einem Prozess namens *bulk flow* bei zunehmender Konzentration passiv weitertransportiert (Dancourt und Barlowe, 2010).

HSV-1 kodiert 19 potenzielle Membranproteine, darunter zwölf Glykoproteine, von denen nur sechs in allen Herpesviren konserviert vorkommen (siehe Tabelle 2.1). Ihre Funktionen sind nur teilweise aufgeklärt, naturgemäß scheinen sie v.a. an Prozessen beteiligt zu sein, die sich an den verschiedensten zellulären Membranen abspielen. Nur wenige Deletionsmutanten - nämlich gH/gL, gB, pUL34 und gD - resultieren in einem Unvermögen zu replizieren (Spear *et al.*, 2000; McGeoch *et al.*, 2006), was eine funktionelle Redundanz zumindest einiger viraler Membranproteine impliziert. Besonders ihre Rolle während des Virus *entry* ist gut charakterisiert, wobei gC und gD der Partikeladsorption an der Zelloberfläche dienen und gH/gL sowie gB in einer konzertierten Aktion die Membranfusion initiieren (Campadelli-Fiume und Menotti, 2007). Andere Vorgänge des Replikationszyklus sind weniger gut erforscht. Das Typ-II Protein pUL45 scheint besonders bei der

Virusaufnahme auf endozytotischem Weg die Membranfusion zu fördern (Dollery *et al.*, 2010), und das in der INM inserierte pUL34 ist zusammen mit seinem Interaktionspartner pUL31 an der primären Umhüllung der Nukleocapside beteiligt (Roller *et al.*, 2000; Reynolds *et al.*, 2001). Für die Membranfusion der perinukleären Virionen mit der ONM wird eine Funktion von gH und gB diskutiert (Farnsworth *et al.*, 2007; Wisner *et al.*, 2009), während der Komplex aus gE/gI an der Virusausbreitung über Zell-Zellkontakte beteiligt ist (Campadelli-Fiume, 2007). Die Typ-III Membranproteine gK und pUL20 scheinen eine fusionsinhibitorische Wirkung zu besitzen, die der durch gH/gL und gB induzierten Zell-Zellfusion entgegenwirkt (Chouljenko *et al.*, 2010). Die sekundäre Umhüllung von tegumentierten Nukleocapsiden an TGN-Membranen muss auf die Beteiligung viraler Membranproteine angewiesen sein, als mögliche Kandidaten werden gD, gE/gI, gM sowie gB gehandelt (Brack *et al.*, 1999; Farnsworth *et al.*, 2007; Johnson *et al.*, 2011). Die massenspektrometrische Analyse reifer Viruspartikel konnte zwölf Membranproteine als Komponenten identifizieren, zusätzlich wurde pUL20 mittels Western Blot nachgewiesen (Loret *et al.*, 2008). Insgesamt sind die viralen Membranproteine wichtig für den korrekten Ablauf des HSV-1 Lebenszyklus, auch wenn ihre Funktionen teilweise redundant sein mögen. Weitere Aufklärung der Prozesse, an denen Membranproteine beteiligt sind, kann besonders durch die Erforschung ihrer Wechselwirkungen untereinander sowie mit anderen viralen und zellulären Komponenten erzielt werden.

**Tabelle 2.1: Membranproteine des HSV-1**

ORF†	Name	Typ	Viruskomponente*	Funktion‡
<u>UL1</u>	gL	peripher assoziiert	ja	komplexiert mit gH (UL22); vermittelt Membranfusion, Virus entry
<u>UL10</u>	gM	Typ-III	ja	beteiligt an sekundärer Umhüllung; komplexiert mit gN (UL49A)
UL20	-	Typ-III	ja (Western Blot)	interagiert mit gK (UL53); intrazellulärer Partikeltransport; inhibiert Membranfusion
<u>UL22</u>	gH	Typ-I	ja	komplexiert mit gL (UL1); vermittelt Membranfusion, Virus entry, auch nukleärer egress
<u>UL27</u>	gB	Typ-I	ja	Membranfusogen, Virus entry, auch nukleärer egress
<u>UL34</u>	-	tail-anchor	nein	interagiert mit pUL31; nuclear egress complex
UL43	-	Typ-III	nein	PRV-Ortholog involviert in Fusionsprozesse
UL44	gC	Typ-I	ja	Adsorption während Virus entry; moduliert Komplementaktivierung
UL45	-	Typ-II	ja	beteiligt an Membranfusion, besonders während Endozytose
<u>UL49A</u>	gN	Typ-I	nein	komplexiert mit gM (UL10); PRV-Ortholog inhibiert Membranfusion

ORF†	Name	Typ	Viruskomponente*	Funktion‡
UL53	gK	Typ-III	nein	interagiert mit pUL20; inhibiert Membranfusion, sekundäre Umhüllung
UL56	-	<i>tail-anchor</i>	ja	HSV-2-Ortholog involviert in Transport und Freisetzung von Virionen
US4	gG	Typ-I	ja	Funktion unbekannt
US5	gJ	Typ-I	nein	blockiert Apoptose
US6	gD	Typ-I	ja	Virus <i>entry</i> , bindet an Zelloberflächenrezeptoren
US7	gI	Typ-I	ja	komplexiert mit gE (US8); Fc-Rezeptor, <i>cell-to-cell spread</i>
US8	gE	Typ-I	ja	komplexiert mit gI (US7); Fc-Rezeptor, <i>cell-to-cell spread</i>
US8A	-	Typ-II	nein	Funktion unbekannt
US9	-	Typ-II; evtl. <i>tail anchor</i>	ja	PRV: benötigt für anterograden Transport der Virionen im Axon

† = konservierte ORFs sind unterstrichen

\* = massenspektrometrische Analyse reifer Virionen (Loret *et al.*, 2008)

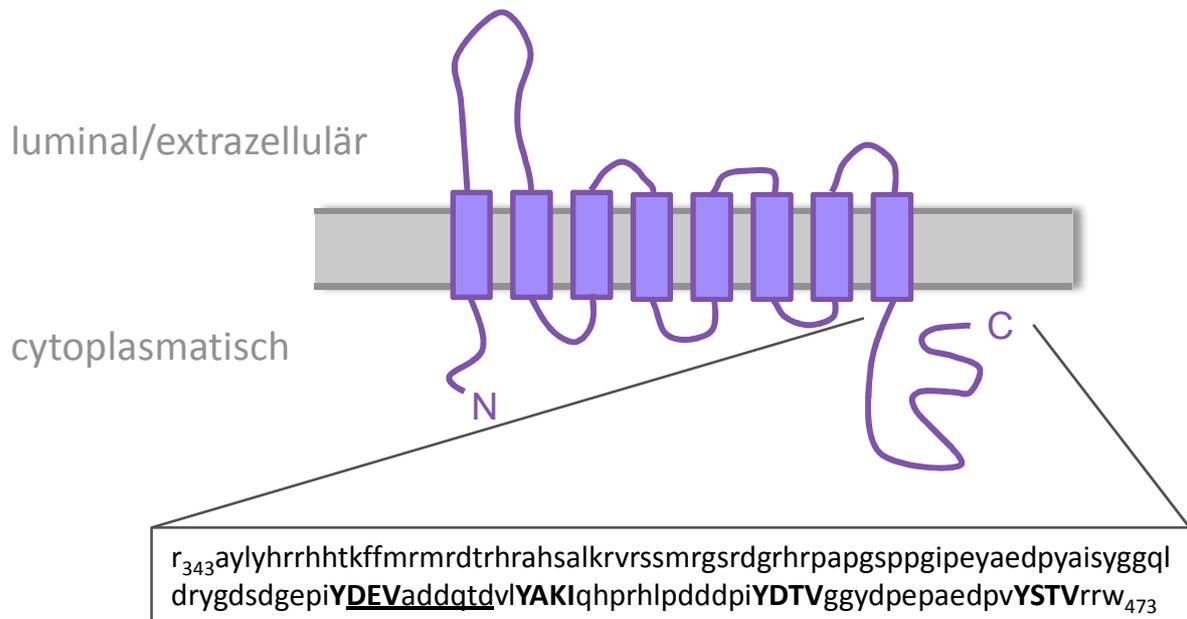
‡ = nach Roizman *et al.*, 2007

### 2.2.3.1 Glykoprotein M (gM)

Das herpesvirale Glykoprotein M (gM) ist eines der wenigen innerhalb der Herpesvirusfamilie konservierten Membranproteine. Obwohl diese Konservierung auf eine bedeutende Funktion während des Replikationszyklus hinweist, ist die funktionelle Relevanz von gM stark variabel. Einerseits ist es für die Replikation mancher Spezies in Zellkultur essenziell (Hobom *et al.*, 2000; Tischer *et al.*, 2002; May *et al.*, 2005), nämlich in hCMV (ein  $\beta$ -Herpesvirus), MuHV-4 (Murides Herpesvirus 4, ein  $\gamma$ -Herpesvirus der Maus) und GaHV-2 (Gallides Herpesvirus 2, ein  $\alpha$ -Herpesvirus des Huhns). Für die meisten untersuchten Vertreter der  $\alpha$ -Herpesviren - auch HSV-1 - ist es allerdings entbehrlich und funktionell redundant zu anderen Viruskomponenten (Baines und Roizman, 1991; Dijkstra *et al.*, 1996; Osterrieder *et al.*, 1996; Fuchs und Mettenleiter, 1999; Browne *et al.*, 2004; Leege *et al.*, 2009; Sadaoka *et al.*, 2010).

Das Glykoprotein M von HSV-1 wird durch UL10 kodiert und besteht aus 473 Aminosäuren. Es zählt zu den Typ-III Membranproteinen mit laut Vorhersage (CBS TMHMM Server v. 2.0; <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) acht TM-Domänen und einer Topologie, bei der sowohl N- als auch C-Terminus cytoplasmatisch exponiert sind (siehe Abbildung 2.4). Auf Proteinebene lässt sich ein Vorläuferprotein (47 kDa) von der durch Glykosylierung gereiften Form (53-63 kDa) unterscheiden (Baines und Roizman, 1993). Eigentlich als Protein der späten oder  $\gamma$ -Expressiongruppe klassifiziert (Roizman *et al.*, 2007), kann es bereits wenige Stunden nach der Infektion und vor Beginn der viralen DNA-Replikation detektiert werden (Stingley *et al.*, 2000; Zhang

*et al.*, 2009). Glykoprotein M bildet einen Komplex mit Glykoprotein N (UL49A), einem ebenfalls konservierten Typ-I Membranprotein (Fossum *et al.*, 2009). Für die PRV-Homologen konnte gezeigt werden, dass die Interaktion über eine Disulfidbrücke vermittelt wird (Jons *et al.*, 1998), wahrscheinlich unter Beteiligung eines konservierten Cysteinrests in der ersten luminalen Schleife (Crump *et al.*, 2004).



**Abbildung 2.4: Potenzielle Topologie von HSV-1 gM**

Das Glykoprotein M (gM) von HSV-1 besitzt laut Vorhersage (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) acht TM-Domänen und eine Topologie, bei der sowohl N- als auch C-Terminus cytoplasmatisch exponiert sind. Die Sequenz des cytoplasmatisch exponierten C-Terminus trägt mehrere potenzielle *trafficking*-Motive, nämlich Tyrosin-basierte Motive mit der Konsensus-Sequenz YXX $\phi$  (Y = Tyrosin, X = Aminosäure jeglicher Art,  $\phi$  = sperrige hydrophobe Aminosäure; fett und in Großbuchstaben) sowie eine Anhäufung saurer Aminosäuren (*acidic cluster*; unterstrichen). Beide Motive sind an der Endozytose von Membranproteinen sowie möglicherweise am Transport vom ER zum Golgi-Apparat beteiligt (Favoreel, 2006).

Während der Infektion lokalisiert gM an den Kernmembranen, am TGN und an der Plasmamembran (Baines und Roizman, 1993; Crump *et al.*, 2004; Wills *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009). Für die Rekrutierung zur INM ist der *nuclear egress complex* (NEC) aus pUL34/pUL31 nötig (Wills *et al.*, 2009), was für eine unreife Form von gM nicht gilt, die bereits sehr früh nach der Infektion im Kern detektiert wird (Zhang *et al.*, 2009). Insgesamt scheint die subzelluläre Verteilung von gM stark reguliert zu sein. Im Einklang mit seiner Lokalisierung wird gM sowohl in perinukleäre Virionen als auch in reife Partikel inkorporiert (Baines *et al.*, 2007; Loret *et al.*, 2008). Neben einer möglichen Funktion von gM während des *nuclear egress*, sprechen mehrere Befunde für eine Beteiligung während der sekundären Umhüllung an TGN-Membranen. So sorgt gM im virusfreien Kontext für die Relokalisierung von gH/gL sowie gD von der Plasmamembran zum TGN (Crump *et al.*, 2004), was der

Konzentrierung von viralen Membranproteinen am Ort der sekundären Umhüllung und damit einer effizienten Bildung und Auswanderung von Viruspartikeln dienen könnte. Darüber hinaus wurde bei der Infektion einer gM-defizienten HSV-1 Mutante eine erhöhte Anzahl nicht-umhüllter cytoplasmatischer Capside beobachtet (Browne *et al.*, 2004). Außerdem inhibiert gM die durch gB, gH/gL und gD induzierte Membranfusion (Klupp *et al.*, 2000; Koyano *et al.*, 2003; Crump *et al.*, 2004), möglicherweise durch Änderung von Membraneigenschaften oder Interaktion mit der Fusionsmaschinerie.

Die Verteilung von gM auf verschiedene zelluläre Membranen im Verlauf der Infektion lässt auf Transportsignale innerhalb der Proteinsequenz schließen, die von den verschiedenen Transportsystemen erkannt werden. Tatsächlich besitzt gM mehrere potenzielle *trafficking*-Motive im cytoplasmatisch exponierten C-Terminus (siehe Abbildung 2.4). Tyrosin-basierte Motive mit der Konsensus-Sequenz YXX $\phi$  (Y = Tyrosin, X = Aminosäure jeglicher Art,  $\phi$  = sperrige hydrophobe Aminosäure) können teilweise zusammen mit einer Gruppe saurer Aminosäuren (*acidic cluster*) als Signalmotive für die Endozytose von Membranproteinen sowie möglicherweise dem Proteintransport vom ER zum Golgi-Apparat dienen (Favoreel, 2006). Für MuHV-4 und hCMV konnte gezeigt werden, dass der cytoplasmatisch exponierte C-Terminus mit seinen Tyrosin-basierten Motiven und einem *acidic cluster* zur Virusreplikation benötigt wird (Krzyzaniak *et al.*, 2007; May *et al.*, 2008).

### 2.3 Funktionelle Genomik: Interaktionsnetzwerke des HSV-1

Die funktionelle Genomik als Teilgebiet der Molekularbiologie beschreibt die Funktionen und Interaktionen von Genen und Proteinen mit Hilfe der Analyse großer Datenmengen. Der Fokus liegt dabei vor allem auf nicht-statischen Aspekten wie Protein-Protein-Interaktionen, aber auch Transkription und Translation von Genen. Durch das Studium komplexer Systeme aus der Vogelperspektive können Zusammenhänge auch funktioneller Art identifiziert werden, woraus sich ein besseres Verständnis der dynamischen Prozesse innerhalb eines Systems entwickelt. Diese Daten bilden die Grundlage der Systembiologie, um lebende Systeme simulieren zu können und die Effekte einer Manipulation vorherzusagen (Titz *et al.*, 2004).

Interaktionsnetzwerke auf Proteinebene (sogenannte Interaktome) dienen der grafischen Darstellung von Interaktionsdaten, die meist im Hochdurchsatzverfahren gewonnen werden. Sind die Funktionen einiger Proteine des Interaktoms bereits bekannt, können erste Hinweise auf die Funktionalität nicht-charakterisierter Proteine gewonnen werden. Es gibt verschiedene Methoden, mit denen Interaktionsdaten generiert werden können, am weitesten verbreitet ist dabei das Hefe-2-Hybridsystem (Fields und Song, 1989) (siehe 3.3.7.1). Um die Verlässlichkeit der gewonnen Daten zu

überprüfen, werden sie häufig mit Hilfe einer zweiten Methode verifiziert oder mit demselben System auf Reproduzierbarkeit getestet. Mit zunehmendem Einsatz von Robotern und informatischer Datenverarbeitung konnten im letzten Jahrzehnt viele Interaktionsdaten sowohl auf subzellulärer als auch auf Organismus-Ebene veröffentlicht werden (Vidal *et al.*, 2011). Die Datenlage reicht dabei von verschiedenen Modellorganismen wie *S. cerevisiae* (Uetz *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2001), *C. elegans* (Li *et al.*, 2004) oder *D. melanogaster* (Giot *et al.*, 2003) über bakterielle und virale Krankheitserreger wie z.B. *M. tuberculosis* (Raman und Chandra, 2008) oder Hepatitis-C-Virus (de Chassey *et al.*, 2008) bis hin zum Menschen selbst (Rual *et al.*, 2005; Stelzl *et al.*, 2005).

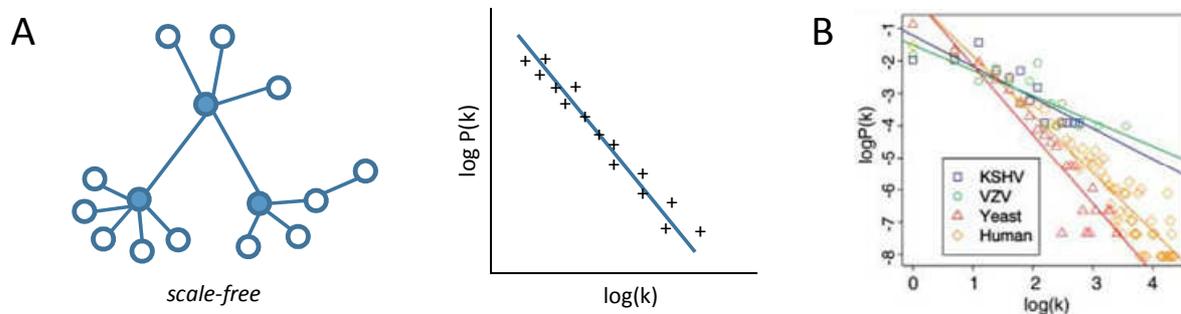
In Proteininteraktionsnetzwerken sind die Proteine als Knoten (*nodes*) und die Interaktion als Verbindungslinie (*edges*) zwischen ihnen dargestellt (Titz *et al.*, 2004). Obwohl diese Darstellung die dynamischen Prozesse der Proteininteraktionen nicht widerspiegelt, gibt sie doch einen guten Überblick über das Interaktom und seine Eigenschaften. Wie viele Netzwerke aus dem Bereich der Soziologie oder Technik besitzen auch biologische Netzwerke eine Topologie, die als skalenfrei (*scale-free*) bezeichnet wird (siehe Abbildung 2.5). Dabei folgt der Verknüpfungsgrad  $k$  (*degree*) eines Knotens einer Potenzfunktion ( $P(k) \sim k^{-\gamma}$ ), also bilden wenige Knoten hochvernetzte *hubs*, während die meisten Knoten nur einen geringen Verknüpfungsgrad besitzen (Jeong *et al.*, 2000; Wagner und Fell, 2001; Barabasi und Oltvai, 2004). Diese Eigenschaft trägt zur Robustheit eines komplexen Systems gegenüber Ausfällen innerhalb des Systems bei (Newman, 2003). Obwohl große Netzwerke zunächst sehr komplex erscheinen, sind sie hierarchisch in funktionelle Module und Submodule unterteilt (*clustering*) (Hartwell *et al.*, 1999). Typisch ist auch, dass zwei beliebige Knoten über recht wenige Verbindungslinien miteinander verknüpft sind, ein Effekt, den man als *small-world* bezeichnet (Watts und Strogatz, 1998).

### 2.3.1 Intravirale Interaktionen

Aufgrund ihres vergleichsweise kleinen Genoms eignen sich Viren besonders gut für eine genomweite Analyse ihrer Proteininteraktionen. Ein solches intravirales Netzwerk hilft dabei, ein komplexes System wie ein Humanpathogen zu verstehen. Zunächst gewinnt man einen Überblick über das Zusammenspiel der viralen Proteine im Verlauf der Infektion. Daraus lassen sich Hypothesen ableiten, wie die einzelnen Proteine miteinander interagieren, aber auch reguliert oder modifiziert werden (Uetz *et al.*, 2004). Interaktionsdaten von Proteinen mit bekannter Funktion geben Hinweise auf eine mögliche Funktion uncharakterisierter Interaktionspartner und vereinfachen damit weitergehende funktionelle Untersuchungen. Der Vergleich von Interaktomen innerhalb einer Virusfamilie kann helfen, evolutionär konservierte Strategien offenzulegen.

Die genomweite Analyse viraler Proteininteraktionen beschränkt sich bisher auf wenige Spezies. Dazu gehören kleine RNA-Viren (Choi *et al.*, 2000; Flajolet *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2001), aber auch der T7-Bakteriophage (Bartel *et al.*, 1996) und das Vaccinia-Virus (McCraith *et al.*, 2000). Der Fokus liegt allerdings sehr stark auf verschiedenen Mitgliedern der Herpesvirusfamilie, wie HSV-1 (Vittone *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2008), EBV (Calderwood *et al.*, 2007), KSHV (Rozen *et al.*, 2008) und VZV (Uetz *et al.*, 2006). Durch den Vergleich der Interaktionsnetzwerke von fünf Herpesviren konnte ein evolutionär konserviertes Interaktom dargestellt werden (Fossum *et al.*, 2009).

Die bisher untersuchten intraviralen Netzwerke besitzen eine leicht abweichende Topologie im Vergleich zu ihren zellulären Pendanten (Uetz *et al.*, 2006). Hier finden sich zwar ähnlich viele hochverknüpfte *hubs*, allerdings gibt es nur sehr wenige Knoten mit einem Verknüpfungsgrad von 1, was untypisch für skalenfreie Netzwerke ist (siehe Abbildung 2.5). Resultierend aus einem unüblich niedrigen Potenzkoeffizienten  $\gamma$  ergibt sich daraus bei logarithmischer Auftragung ein flacherer Verlauf der Regressionsgeraden im Vergleich zu zellulären Netzwerken. Die intraviralen Interaktome verfügen zwar auch über insgesamt kurze Pfadlängen, sind aber nicht in miteinander verbundene Submodule unterteilt, sondern stellen ein einziges hochvernetztes Modul dar. Aufgrund dieser ungewöhnlichen Netzwerkeigenschaften sind die intraviralen Netzwerke besser gegen Angriffe von außen gewappnet als zelluläre Interaktome.



**Abbildung 2.5: Topologie von Interaktionsnetzwerken**

(A) Charakteristisch für Interaktionsnetzwerke auf Proteinebene ist die sogenannte skalenfreie (*scale-free*) Topologie. Wenige Knoten (*nodes*) haben einen hohen Verknüpfungsgrad  $k$  (*degree*) und dienen als hochvernetzte *hubs*, während die meisten Knoten nur wenige Verbindungslinien (*edges*) besitzen. Ihre Gradverteilung folgt der Potenzfunktion  $P(k) \sim k^{-\gamma}$ , wobei  $\gamma$  die Steigung der Regressionsgeraden bei logarithmischer Auftragung angibt (modifiziert nach Jeong *et al.*, 2000). (B) Intravirale Netzwerke besitzen im Vergleich zu zellulären Interaktomen zwar ähnlich viele *hubs*, jedoch nur sehr wenige Knoten mit niedrigen Verknüpfungsgraden. Daraus ergibt sich ein unüblich niedriger Potenzkoeffizient  $\gamma$  der Gradverteilung, bei logarithmischer Auftragung ist die Steigung der Regressionsgeraden flacher (Uetz *et al.*, 2006).

### 2.3.2 Virus-Wirt Interaktionen

Ebenso bedeutsam wie das Erstellen intraviraler Interaktionsnetzwerke ist die Aufklärung der direkten Wechselwirkungen zwischen den Proteinen von Wirtszelle und Virus. Neben den vielen üblicherweise im kleinen Maßstab identifizierten und charakterisierten Protein-Protein-Interaktionen gewinnen zunehmend genomweite Analysen von Virus-Wirt Interaktionen an Bedeutung (Mendez-Rios und Uetz, 2010). Proteininteraktionsdaten viraler und zellulärer Proteine (sogenannte *virhostome*) wurden z.B. für EBV (Calderwood *et al.*, 2007), Influenzavirus H1N1 (Shapira *et al.*, 2009) sowie Hepatitis-C-Virus (de Chassey *et al.*, 2008) generiert.

Mit Hilfe solcher systematischer Datensätze ist es möglich, den Ablauf des viralen Replikationszyklus besser zu verstehen und weiter aufzuklären. Außerdem bietet sich die Möglichkeit, wichtige Interaktionen zu identifizieren und als potenzielle Ziele antiviraler Medikamentenentwicklung zu nutzen (Maxwell und Frappier, 2007). Über den Vergleich zellulär-viraler Interaktome verschiedener Spezies können konservierte Strategien der Infektion und Replikation entdeckt werden, die ebenfalls zum Fortschritt antiviraler Therapien beitragen können (Bailer und Haas, 2009). Darüber hinaus lassen sich Virus-Wirt Netzwerke in übergeordnete zelluläre Netzwerke integrieren, um den Zustand einer infizierten Zelle zu simulieren (Uetz *et al.*, 2006). So lassen sich Schwachpunkte im zellulären Netzwerk finden, die häufig als Angriffspunkte der viralen Infektion dienen (Vidal *et al.*, 2011). Es wurde beispielsweise beobachtet, dass virale Proteine bevorzugt mit zellulären *hubs* interagieren (Calderwood *et al.*, 2007; Shapira *et al.*, 2009). Besonders die Kombination von Interaktionsdaten mit globalen funktionellen Analysen, wie z.B. RNA-Interferenzstudien (RNAi), ermöglicht ein vertieftes Verständnis der Prozesse während der Infektion sowie deren Simulation *in silico* mit Hilfe systembiologischer Modelle.

#### 2.3.2.1 Die zelluläre ESCRT-Maschinerie

Viele umhüllte RNA-Viren - wie *Retroviridae*, *Filoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Arenaviridae* und *Paramyxoviridae* - nutzen ein zelluläres System, um durch Knospung an der Zellmembran oder anderen Membrankompartimenten ihre Membranhülle zu bilden (Morita und Sundquist, 2004; Bieniasz, 2006). Diese sogenannte ESCRT-Maschinerie (*endosomal sorting complex required for transport*) besteht aus mehreren Multiproteinkomplexen und Regulatoren (siehe Tabelle 2.2) und wurde ursprünglich im Zusammenhang mit der endosomalen Proteinsortierung in *S. cerevisiae* entdeckt (Raymond *et al.*, 1992). Zum Abbau bestimmte Membranproteine werden zunächst durch eine konzertierte Aktion der ESCRT-Komplexe in intraluminale Vesikel (ILV) an Endosomen verpackt, wodurch sogenannte *multivesicular bodies* (MVB) entstehen (Raiborg und Stenmark, 2009). Die Fusion der MVB mit Lysosomen führt zum Abbau der ILV und Degradation der Proteinfracht

(Katzmann *et al.*, 2002). Hierbei handelt es sich um einen evolutionär stark konservierten Mechanismus, der an der Regulation biologischer Prozesse wie der Biogenese von *multivesicular bodies* (MVB), Cytokinese, möglicherweise Autophagie sowie viralen Knospungsereignissen beteiligt ist (Hurley und Hanson, 2010). Da hefe genetische Studien erstmals zur Identifizierung der VPS-Gene (*vacuolar protein sorting*) als ESCRT-Komponenten führten, basiert die funktionelle Aufklärung der ESCRT-Maschinerie, inklusive Interaktionen der verschiedenen Komponenten sowie Proteinstrukturen, hauptsächlich auf der Analyse von Hefeproteinen (Bowers *et al.*, 2004; Kostelansky *et al.*, 2006; Wollert und Hurley, 2010). Die funktionelle Konservierung des ESCRT-Mechanismus erlaubt allerdings die Übertragung auf die homologen Proteine in Säugetierzellen (siehe Tabelle 2.2). Sehr ungewöhnlich ist dabei die Richtung des Knospungsereignisses, die entgegengesetzt zur üblichen zellulären Vesikelbildung - nämlich aus dem Cytoplasma in das Lumen hinein - verläuft (Hurley und Hanson, 2010).

**Tabelle 2.2: ESCRT-Untereinheiten und assoziierte Proteine (nach Hurley und Hanson, 2010)**

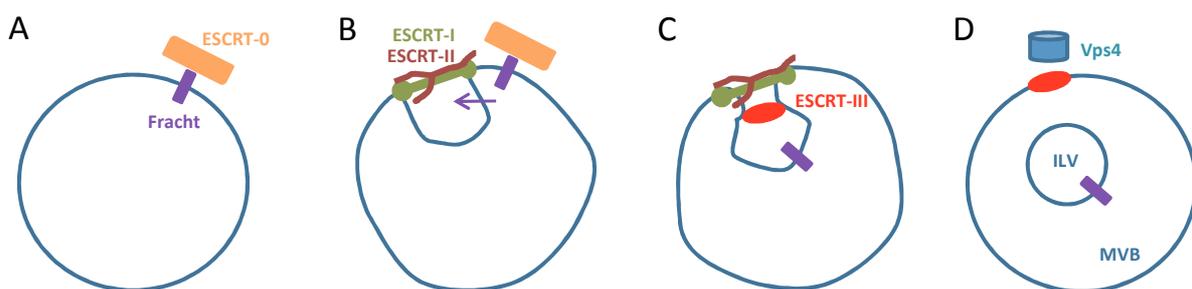
Gruppe	Funktion	Protein (Hefe)	Protein (human)	Funktion
ESCRT-0	Zusammenlagerung von ubiquitiniertes Fracht	Vps27	HRS	bindet PI3P-haltige Membranen, ESCRT-I, Ub und Clathrin
		Hse1	STAM1, STAM2	bindet Ub und DUBs
ESCRT-I	Membranknospung (zusammen mit ESCRT-II)	Vps23	TSG101 (VPS23)	bindet Ub und ESCRT-0; auch retrovirales Gag-Protein über P(T/S)AP-Motiv
		Vps28	VPS28	bindet ESCRT-II
		Vps37	VPS37A, VPS37B, VPS37C, VPS37D	bindet an Membranen; bindet IST1 (in Säugerzellen)
		Mvb12	MVB12A, MVB12B	stabilisiert ESCRT-I Oligomere; bindet Ub
ESCRT-II	Membranknospung (zusammen mit ESCRT-I)	Vps22	VPS22 (EAP30, SNF8)	bindet an Membranen
		Vps25	VPS25 (EAP20)	rekrutiert und aktiviert ESCRT-III über Bindung von Vps20
		Vps36	VPS36 (EAP45)	bindet Phosphoinositid-haltige Membranen, Ub und ESCRT-I
ESCRT-III	Membranabschnürung	Vps20	VPS20 (CHMP6)	initiiert ESCRT-III Aufbau durch Bindung an Snf7; initiiert Membranspaltung; bindet Vps4 für ESCRT-III Abbau
		Snf7 (Vps32)	SNF7A, SNF7B, SNF7C (CHMP4A, CHMP4B, CHMP4C)	Haupttreiber der Membranspaltung, rekrutiert DUBs (in Hefen); bindet Proteine mit Bro1-Domäne (auch ALIX)
		Vps24	VPS24 (CHMP3)	beendet Membranspaltung, rekrutiert DUB AMSH (in Säugerzellen)

Gruppe	Funktion	Protein (Hefe)	Protein (human)	Funktion
		Vps2	VPS2A, VPS2B (CHMP2A, CHMP2B)	rekrutiert Vps4, initiiert ESCRT-III Abbau
ESCRT-III-verwandt	Regulation der Membranabschnürung und Abbau des ESCRT-III Komplexes	Did2 (Vps46)	CHMP1A, CHMP1B (DID2A, DID2B)	rekrutiert Vps4
		Vps60	CHMP5	bindet Vta1 mit hoher Affinität
		Ist1	IST1	bindet Vps4, Vta1, Did2 und ESCRT-I
		-	CHMP7	bindet SNF7B und DUB UBPY
VPS4 und VTA1	Abbau des ESCRT-III Komplexes	Vps4	VPS4A, VPS4B	AAA+ ATPase; Oligomer; Abbau von ESCRT-III
		Vta1	VTA1 (LIP5)	bindet ESCRT-III und -verwandte Proteine; bindet Vps4 zur Förderung der Oligomerisierung und ESCRT-III-Recycling
Andere	Modulatorische Funktionen	Bro1 (Vps31)	ALIX (PDCD6IP, AIP1)	rekrutiert Snf7 zur Membranspaltung; rekrutiert DUBs; bindet virale YPX <sub>n</sub> L-Motive

AAA+ = *ATPases associated with diverse cellular activities*; AMSH = *associated molecule with the SH3 domain of STAM*; DUB = Deubiquitinierendes Enzym; PI3P = Phosphatidylinositol-3-Phosphat; Ub = Ubiquitin; UBPY = Ubiquitin Isopeptidase Y

Die klassische Funktion der ESCRT-Maschinerie dient dem Abbau von ubiquitinierten Membranproteinen, wie z.B. Membranrezeptoren. Die Rekrutierung der vier ESCRT-Komplexe und ESCRT-assoziiierter Proteine erfolgt sequenziell. Der ESCRT-0 Komplex besitzt mehrere Ub-Bindestellen (Ubiquitin) und bindet an PI3P-haltige (Phosphatidylinositol-3-Phosphat) Membranen (Ren und Hurley, 2010), durch die Interaktion mit ubiquitinierten Membranproteinen am Endosom werden Frachtproteine angereichert (Wollert und Hurley, 2010). Die Anwesenheit von ESCRT-0 an Membranen des frühen Endosoms rekrutiert die beiden Komplexe ESCRT-I und -II, die jeweils aus Heterotetrameren aufgebaut sind und zumindest in Hefen einen Superkomplex bilden (Teo *et al.*, 2006; Gill *et al.*, 2007). Beide ESCRT-Untereinheiten besitzen selbst Ub-Bindestellen, weshalb ein Modell der Frachtübergabe von einem Komplex zum nächsten wahrscheinlich ist (Raiborg und Stenmark, 2009). Zusammen induzieren ESCRT-I/-II das Knospungsereignis an der Endosomenmembran und lokalisieren dabei nicht im Vesikellumen, sondern exklusiv am Knospungshals. Der genaue Mechanismus der Knospenbildung ist nicht geklärt, die Strukturaufklärung der beteiligten Komplexe legt allerdings folgendes Modell nahe (Kostelansky *et al.*, 2006; Hurley und Hanson, 2010): Sowohl ESCRT-I als auch -II besitzen eine dreidimensionale Struktur von ca. 27 nm, bei der multivalente Bindungsstellen (Ub-Bindestellen, Membran-Bindedomänen sowie Bindestellen zu den verschiedenen ESCRT-Untereinheiten) durch eine längliche, steife Struktur getrennt werden. Über die gegenseitige Bindung sowie die Interaktion mit

der Endosomenmembran könnte ESCRT-I/-II die Membran in Richtung Lumen auswuchten und so den Knospenhals stabilisieren. Darüber hinaus sorgen sie für den Einschluss der Frachtproteine im knospenden Vesikel (Wollert und Hurley, 2010). Beide Komplexe rekrutieren ESCRT-III, ein dynamisches Polymer, das die Spaltung der Membran am Knospungshals katalysiert. Der ESCRT-III Komplex besteht aus Vps20, Snf7, Vps24 und Vps2, und wird in dieser Reihenfolge und in keinem streng definierten Verhältnis aufgebaut. Die ersten drei Komponenten sind an der Membranspaltung beteiligt, wobei Snf7 die wirksamste Untereinheit darstellt, während Vps2 für die Rekrutierung der AAA+ ATPase Vps4 sorgt (Wollert *et al.*, 2009). Ein rechnerisch entwickeltes Modell postuliert, dass die Komponenten des ESCRT-III sich spiralförmig in einer kuppelartigen Struktur im Knospungshals anordnen, dadurch den Hals verengen und so die Trennung des ILV von der Endosomenmembran fördern (Fabrikant *et al.*, 2009). Die einzige thermodynamisch treibende Kraft in diesem Prozess der ILV-Bildung ist die Kopplung des ESCRT-III Abbaus und Recyclings mit der ATP-Hydrolyse durch Vps4 (Babst *et al.*, 1998; Wollert *et al.*, 2009). Strukturelle Untersuchungen von Vps4 legen nahe, dass es einen ringförmigen, dodekameren Zylinder bildet (Scott *et al.*, 2005; Gonciarz *et al.*, 2008; Landsberg *et al.*, 2009), dessen Oligomerisierung durch Vta1 gefördert wird (Xiao *et al.*, 2008). Die MIT-Domäne von Vps4 (*microtubule interacting and transport*) interagiert mit MIM-Domänen (*MIT-interacting motif*), die in fast allen Komponenten des ESCRT-III bzw. ESCRT-III-verwandten Proteinen enthalten sind (Obita *et al.*, 2007; Stuchell-Brereton *et al.*, 2007; Kieffer *et al.*, 2008). Über diese Interaktion werden die ESCRT-III Untereinheiten in und möglicherweise auch durch die zentrale Pore von Vps4 gezogen und als Monomere in das Cytosol entlassen. Did2, Ist1 und Vps60 sind neben Vta1 weitere regulatorische Proteine von Vps4 (Hurley und Hanson, 2010).



**Abbildung 2.6: Molekularer Mechanismus der MVB Biogenese**

Aktuelles Modell der Biogenese von *multivesicular bodies* (MVB) durch die ESCRT-Maschinerie (*endosomal sorting complex required for transport*). (A) ESCRT-0 assembliert, indem es zur lysosomalen Degradation bestimmte Membranproteine an der Endosomenmembran bindet. (B) ESCRT-I und -II besitzen Membranbindestellen, die durch steife Strukturen getrennt sind, und könnten so die Knospenbildung induzieren. Frachtproteine werden im entstehenden Vesikel konzentriert. (C) Proteine des ESCRT-III Komplexes lagern sich spiral- und kuppelförmig im Knospungshals an und fördern so die Membranspaltung. (D) Die AAA+ ATPase Vps4 betreibt energieabhängig den Abbau des ESCRT-III Komplexes. Die Frachtproteine sind nun in intraluminalen Vesikeln (ILV) eingeschlossen (modifiziert nach Wollert und Hurley, 2010).

Die ungewöhnliche Richtung des durch die ESCRT-Maschinerie induzierten Knospungsprozesses bietet sich für die Knospung membranumhüllter Viren aus dem Cytosol heraus an und wird auch tatsächlich von vielen Virusspezies genutzt (Morita und Sundquist, 2004; Bieniasz, 2006; Welsch *et al.*, 2007). Dies ist besonders gut für HIV-1 (Humanes Immundefizienzvirus-1) charakterisiert, dessen Protein Gag die Knospungbildung zwar selbst induzieren kann, zur Membranspaltung allerdings den ESCRT-III Komplex benötigt. Dieser wird durch die Interaktion von Gag mit ESCRT-I und ALIX zur Knospungsstelle an der Cytoplasmamembran rekrutiert und ermöglicht die Freisetzung umhüllter Nachkommenviren (Hurley und Hanson, 2010). Die Interaktion viraler Proteine mit zellulären Knospungsfaktoren wird teilweise durch sogenannte *late*-Domänen (L-Domänen) vermittelt, deren Mutation zu einem Arrest des *Virus-assembly* in später Phase führt (Parent *et al.*, 1995). Bisher sind drei Typen von L-Domänen und ihre zellulären Partner identifiziert worden (Morita und Sundquist, 2004). Das P(T/S)AP-Motiv rekrutiert TSG101, ALIX bindet an die YP(X)<sub>n</sub>L-Domäne (n = 1-3) und über PPXY wird die Interaktion zur Familie der HECT Ubiquitin Ligasen hergestellt. Letztere könnten durch die Ubiquitinierung viraler oder zellulärer Faktoren die Rekrutierung der ESCRT-Maschinerie zum Ort des Knospungsereignisses fördern (Bieniasz, 2006).

Verschiedene Befunde weisen darauf hin, dass auch HSV-1 die ESCRT-Maschinerie zur Gewinnung der Hüllmembran nutzen könnte. So inhibiert die Expression von dominant-negativem VPS4 die Produktion umhüllter Viren im Cytoplasma (Crump *et al.*, 2007) und auch VPS24 wird für *assembly* und Freisetzung von HSV-1 benötigt (Calistri *et al.*, 2007). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Glykoprotein B an MVB-Membranen akkumuliert und für das intrazelluläre *trafficking* von gB ein funktioneller ESCRT-Apparat benötigt wird (Calistri *et al.*, 2007). Zur HSV-1 Produktion ist ein funktionaler ESCRT-III Komplex notwendig, die ESCRT-Proteine TSG101 und ALIX scheinen allerdings keine Rolle zu spielen, trotz der Anwesenheit einiger L-Domänen in viralen Faktoren (Pawliczek und Crump, 2009).

## 2.4 Zielsetzung der Arbeit

Der Lebenszyklus des Herpes simplex-Virus 1 erfordert die Querung mehrerer zellulärer Membranen, sowohl beim Eintritt in die Zelle als auch während der Virusmorphogenese. Verschiedene Befunde weisen darauf hin, dass an diesen Schritten die Membranproteine von HSV-1 beteiligt sind, deren Funktionen größtenteils noch unaufgeklärt sind. Um das Zusammenspiel der HSV-1 Membranproteine untereinander und mit anderen viralen Proteinen näher zu beleuchten, sollten mit Hilfe genomweiter Hefe-2-Hybrid-Analysen (Y2H) neue Protein-Protein-Interaktionen (PPI) auf intraviraler Ebene identifiziert werden. Da Membranproteine auf Grund ihrer hydrophoben Domänen weniger gut für das Y2H-System geeignet sind, bot sich die Verwendung von ausschließlich

extramembranären Proteinfragmenten an. Die neuen PPI-Daten tragen so zur Vervollständigung der intraviralen Wechselwirkungen von HSV-1 sowohl im Partikel als auch während der Infektion bei (Fossum *et al.*, 2009). Durch die bioinformatische Darstellung als Interaktionsnetzwerk und den Vergleich mit der Literatur können Rückschlüsse auf die Funktion(en) unbekannter Proteine gezogen und funktionale Gruppierungen aufgedeckt werden. Zur Validierung der positiven Ergebnisse sollte das BRET-System (*bioluminescence resonance energy transfer*) eingesetzt werden und damit gleichzeitig die Eignung dieser Methode zur Untersuchung von PPI der Membranproteine überprüft werden.

Anhand der Y2H-Analyse war es nun möglich, ein auf Grund seiner Interaktionspartner und zentraler Stellung im Interaktom interessantes Membranprotein - nämlich Glykoprotein M (gM) - zur weiteren funktionellen Charakterisierung zu bestimmen. Ziel war es, die Bedeutung der großen, cytoplasmatisch lokalisierten C-terminalen Domäne von gM, mit der alle intraviralen Interaktoren gefunden wurden, hinsichtlich potenzieller *trafficking* Motive zu untersuchen. Dies sollte sowohl im Virus-freien System unter Verwendung von sequenziellen Deletionsmutanten als auch im viralen Kontext geschehen, wozu neue gM-Deletionsmutanten von HSV-1 generiert und bezüglich ihrer Wachstumseigenschaften charakterisiert wurden.

Um die molekularbiologischen Vorgänge während der HSV-1 Replikation besser zu verstehen, ist es von großem Interesse, die Wechselwirkungen zwischen Virus und Wirt zu erforschen. Es gibt Hinweise, dass sich HSV-1 analog zu anderen Viren einer zellulären Maschinerie zur Bildung seiner Membranhülle bedient. Dieser ESCRT-Komplex (*endosomal sorting complex required for transport*) induziert Membranknospungereignisse in einer untypischen, dennoch für das knospende Viruspartikel favorisierten Richtung. Die Identifizierung von PPI zwischen Proteinen der ESCRT-Maschinerie und HSV-1 liefert Anhaltspunkte, ob sich HSV-1 Partikel während der sekundären Umhüllung der ESCRT-Maschinerie bedienen und welche ESCRT-Subkomplexe daran beteiligt sind.

## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Laborgeräte und Software

ABI Prism 7000 Sequence Detection System mit Software	Applied Biosystems
Adobe Photoshop CS	Adobe
Brutschränke	Heraeus, Memmert
Cytoscape v2.8.1 Software	Open Source Platform
DNAMAN 6.0	Lynnon Bio Soft
Elektroporator Biorad Gene Pulser Xcell	Biorad
Expositionskassette für Western Blots, Hypercassette™	Amersham
Filmentwickler FPM-100A	Fuji
Fluoreszenzmikroskop AF6000 mit Kamera und Software	Leica
Geldokumentationssystem EASY 429K, Hood RH-2	Herolab
GraphPad Prism 5	GraphPad Software
Inkubationsschüttler	Kühner, New Brunswick Scientific
Kammern für Agarosegelelektrophorese	Peqlab
Kippschüttler	Edmund Bühler GmbH
Konfokales Laser Scanning Mikroskop TCS SP5 mit Software	Leica
Kühlschrank (4°C)	Liebherr
Kühlzentrifuge 6K15	Sigma
Liquidator96, manuelles 96-Kanal Pipettiergerät	Steinbrenner
Magnetrührer mit Heizplatte	Janke & Kunkel
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss
Mikrowelle	AEG
Multikanalpipetten (50, 200, 1000 µl)	Eppendorf
Multi-Plattenlesegerät FLUOstar OPTIMA	BMG-Labtech
Nasstransfersystem Mini-Protean II	Biorad
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld
Nucleofector 96- <i>well</i> Shuttle System	Lonza
PCR Thermocycler	Applied Biosystems
pH Meter	WTW
Pipetten (20, 200, 1000µl)	Abimed
Pipettierhilfe Accu-Jet Pro	Brand
Proteinelektrophorese System Mini-Protean II	Biorad
Spannungsquellen für die Elektrophorese	Biorad
Spektrometer Libra S12	Biochrom
Spektrophotometer Nanodrop ND-1000	Peqlab
Sterilbank	BDK

Thermomixer comfort	Eppendorf
Tiefkühlschrank (-20°)	Liebherr
Tiefkühltruhe (-80°C)	Forma Scientific Inc.
Tischautoklav LTA 1x2x3	Zirbus Technology
Tischzentrifuge 5417 R	Eppendorf
UV-Transilluminator	LKB
Vortex Mixer	IKA Labortechnik
Wasserbad	Julabo
Zentrifuge Multifuge 3L	Heraeus

### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

0,05% Trypsin-EDTA (1x)	Invitrogen
-Ade/-His/-Leu/-Trp DO Supplement	Clontech
Ampuwa	Fresenius Kabi
Deckgläser, rund 12 mm	Roth
dNTP Mix (jeweils 10mM)	Promega
<i>Dulbecco's Phosphate-buffered Saline</i> (PBS)	Invitrogen
ECL Plus Western Blotting Detection System	GE Healthcare
Effectene Transfektionsreagenz	Qiagen
Einmal-Impfösen, steril	Nunc
Elektroporationsküvetten Gene Pulser, 2mm	Biorad
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Nunc
Fötales Kälberserum (FCS)	Invitrogen
Glaswaren	Duran, Schott
Humane IgG	Sigma Aldrich
Kryo-Röhrchen	Nunc
Kunststoffküvetten für Photometer	Sarstedt
-Leu/-Trp DO Supplement	Clontech
L-Glutamin-Lösung (200mM)	Invitrogen
Lipofectamin 2000	Invitrogen
Liquidatorspitzen	Steinbrenner
Minimal SD Base	Clontech
Mounting Medium	Dianova
Nichtessenzielle Aminosäuren (NEAA, 100x)	Invitrogen
Nitrocellulosemembran	Schleicher und Schüll
Objektträger	Roth
Penicillin/Streptomycin-Lösung (100x)	Invitrogen
Petrischalen	Greiner Bio One
Pipettenspitzen	Fa. Peske GmbH & Co.KG
Mikrotiterplatten (96-well) in U- und F-Form (Polystyren)	Greiner Bio-One
Mikrotiterplatten (96-well), weiß mit durchsichtigem Boden (Polystyren), TC-behandelt	Corning

Reaktionsgefäße (2 ml, 1,5 ml, 0,5 ml)	Eppendorf
Röntgenfilm Cronex 5	Agfa
Serologische Pipetten	Sarstedt
SF Cell Line 96-well Nucleofector Solution	Lonza
Sterilfilter, 0,22 µm	Millipore
Sterilfiltrationseinheiten (250 ml), 0,22 µm	Nunc
Trypanblau Färbelösung (0,4%)	Sigma-Aldrich
Whatman 3MM-Papier	Whatman
Zellkulturmedium 10x MEM ( <i>Minimum Essential Medium</i> )	Invitrogen
Zellkulturmedium D-MEM ( <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> )	Invitrogen
Zellkulturmedium Opti-MEM	Invitrogen
Zellkulturschalen (15 cm, 10 cm, 12-well, 24-well)	Nunc
Zentrifugenbecher 3120, Polypropylen, 250 ml	Nalgene

### 3.1.3 Chemikalien

1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth
2-Deoxy-Galaktose (DOG)	Sigma Aldrich
3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT)	Sigma Aldrich
3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Merck
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma Aldrich
4-Methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-galactopyranosid (4-MUx)	Sigma Aldrich
Agarose für Elektrophorese	Invitrogen
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth
Ammoniumsulfat ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Roth
Ampicillin Natriumsalz	Roth
Bacto Agar	Gibco
Bacto Hefeextrakt	Gibco
Bacto Trypton	Gibco
Bicin	Sigma Aldrich
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Sigma Aldrich
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Merck
Carboxymethylcellulose	Sigma Aldrich
Chloramphenicol	Sigma Aldrich
Coelenterazin, nativ	PJK
D(+)-Galaktose	Roth
D(+)-Glucose-Monohydrat	Roth
D-Biotin	Sigma Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Dodecylsulfat Natriumsalz (SDS)	Roth
Eisen(II)-sulfat-Heptahydrat (Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> · 7 H <sub>2</sub> O)	Merck
Essigsäure, Eisessig	Roth

Ethanol, absolut (EtOH)	Roth
Ethidiumbromidlösung (10mg/ml)	Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth
Ethylenglycol	Roth
Formaldehyd (37%)	Roth
Gentamycin-Lösung (10 mg/ml)	Sigma Aldrich
Glyzerin	Roth
Isopropanol	Roth
Kaliumacetat (KAc)	Roth
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumhydroxid (KOH)	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Roth
Kanamycin Sulfat	Roth
Kristallviolett	Sigma Aldrich
L-Adenin	Sigma Aldrich
L-Leucin	Sigma Aldrich
L-Tryptophan	Sigma Aldrich
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Roth
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Roth
Manganchlorid-Tetrahydrat (MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O)	Roth
McConkey-Agar	Sigma Aldrich
Methanol	Roth
Milchpulver	Roth
N,N,N,,N,,-Tetramethylendiamin (TEMED)	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck
Paraformaldehyd	Merck
PEG 1000 (Polyethylenglykol)	Fluka
Ponceau S	Roth
Roti-Phenol/Chloroform	Roth
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1) Acrylamid/Bisacrylamid	Roth
Salzsäure (HCl)	Roth
Sorbitol	Roth
Tris	Roth
Triton X-100	Roth
Tween 20	Roth
Xylencyanol	Roth

### 3.1.4 Enzyme, Molekulargewichtsstandards und Kits

Benchmark Protein Ladder	Invitrogen
BP Clonase II Enzyme Mix	Invitrogen
Gene Ruler 1kb DNA Ladder	Fermentas

HotStar HiFidelity Polymerase Kit	Qiagen
LR Clonase II Enzyme Mix	Invitrogen
NucleoBond Xtra Midi Kit	Macherey-Nagel
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Quick Ligation Kit	NEB
Quikchange Site-directed Mutagenesis Kit	Stratagene
Restriktionsendonukleasen	NEB
TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2x)	Applied Biosystems

### 3.1.5 Antikörper und Seren

#### 3.1.5.1 Primäre Antikörper

Tabelle 3.1: Primärantikörper

Antikörper	Anwendung (Verdünnung)	Quelle
Ziege anti-gB	IF (1:200)	Santa Cruz Biotechnology Inc.
Maus anti-HA	IF (1:300)	Invitrogen
Ratte anti-HA	WB (1:1000)	Invitrogen
Kaninchen anti-TGN46	IF (1:50)	AbD Serotec
Kaninchen anti-Calreticulin	IF (1:100)	Sigma
Kaninchen anti-gM	WB (1:1000)	Helena Browne, Cambridge
Maus anti- $\beta$ -Actin	WB (1:500)	abcam
Kaninchen anti-c-myc	IF (1:300)	Cell Signaling
Maus anti-c-myc	IF (1:300)	Invitrogen
Kaninchen anti-ICP0 r190	IF (1:500)	Roger D. Everett, Glasgow
Maus anti-ICP0	WB (1:400)	Santa Cruz Biotechnology Inc.
Kaninchen anti-gD R45	IF (1:1000)	Gary Cohen und Roselyn Eisenberg, Philadelphia
Maus anti-gH LP11	IF (1:10)	Helena Browne, Cambridge

#### 3.1.5.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 3.2: Sekundärantikörper

Antikörper	Anwendung (Verdünnung)	Quelle
Alexa Fluor 488 Ziege anti-Maus	IF (1:500)	Invitrogen
Alexa Fluor 594 Ziege anti-Maus	IF (1:500)	Invitrogen
Alexa Fluor 488 Ziege anti-Kaninchen	IF (1:500)	Invitrogen
Alexa Fluor 594 Ziege anti-Kaninchen	IF (1:500)	Invitrogen
Peroxidase-gekoppelt anti-Maus	WB (1:3000)	Dianova
Peroxidase-gekoppelt anti-Kaninchen	WB (1:3000)	Dianova
Peroxidase-gekoppelt anti-Ratte	WB (1:3000)	Dianova

### 3.1.6 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert.

#### 3.1.6.1 Oligonukleotide für die Rekombinationsklonierung

Die überlappende Sequenz der *attB*-Primer (Oligos 1 und 2) mit den spezifischen Primern ist unterstrichen, Start- und Stoppcodons sind - falls vorhanden - fett gedruckt.

**Tabelle 3.3: Oligonukleotide für die Rekombinationsklonierung**

Nr.	Name	Sequenz (5' → 3')
1	attB forward	GGGGACAAGTTTGTACA <u>AAAAAGCAGGCT</u>
2	attB reverse	GGGGACCACTTTGTACA <u>AGAAAGCTGGGT</u>
3	UL10C_343for	<u>AAAAAGCAGGCT</u> CCGCCATGCGCGCCTATCTGTATCAC
4	UL10C_473rev	<u>AGAAAGCTGGGT</u> CTACCAACGGCGGACGGTGC
5	UL17_for	<u>AAAAAGCAGGCT</u> CCGCCATGAACGCGCACTTGGCC
6	UL17N_657rev	<u>AGAAAGCTGGGT</u> CTAGAGGCGGCGATTAAACCC
7	UL22NΔSP_19for	<u>AAAAAGCAGGCT</u> CCGCCATGCAGGTCCACGACTGGACTG
8	UL22NΔSP_804rev	<u>AGAAAGCTGGGT</u> CTACCCGGGCGCAATTGCGGCC
9	UL27NΔSP_31for	<u>AAAAAGCAGGCT</u> CCGCCATGGCTCCGAGTCCCCCG
10	UL27A_747rev	<u>AGAAAGCTGGGT</u> CTAGCGCCCCAGGTGCCCCATC
11	UL44NΔSP_25for	<u>AAAAAGCAGGCT</u> CCGCCATGGGCTCGGAAACTGCCTCC
12	UL44NΔSP_477rev	<u>AGAAAGCTGGGT</u> CTACTCGATCGCTCGATCAC
13	UL56_for	<u>AAAAAGCAGGCT</u> CCGCCATGGCTTCGGAGGCGGC
14	UL56N_210rev	<u>AGAAAGCTGGGT</u> CTAGCCACAACAGCCCTGTCTG
15	US6NΔSP_26for	<u>AAAAAGCAGGCT</u> CCGCCATGAAATATGCCTTGGTGG
16	US6_A-341_rev	<u>AGAAAGCTGGGT</u> CTAGCCCATGTTGTTCCGGGGTG
17	US7NΔSP_21for	<u>AAAAAGCAGGCT</u> CCGCCATGCTGGTTGTCCGTGGC
18	US7_A-273_rev	<u>AGAAAGCTGGGT</u> CTACTGGGTACCGTTAGCGC
19	US8NΔSP_21for	<u>AAAAAGCAGGCT</u> CCGCCATGGGAACGCCAAAACGTCC
20	US8_A-421_rev	<u>AGAAAGCTGGGT</u> CTACCCTAACCGCAGGGCGC
21	UL1ΔSP_20for	<u>AAAAAGCAGGCT</u> CCGCCATGGGCTTGCCTTCAACC
22	UL1_rev	<u>AGAAAGCTGGGT</u> CTAGAGGCGCCGGGAGTGG
23	US6B_1075for	<u>AAAAAGCAGGCT</u> CCGCCATGGGAATTGTGTACTGGATG
24	US6B_1182rev	<u>AGAAAGCTGGGT</u> CTAGTAAACAAGGGCTG
25	UL21_for	<u>AAAAAGCAGGCT</u> CCGCCATGGAGCTTAGCTACGCCAC
26	UL21 1-267_rev	<u>AGAAAGCTGGGT</u> CTTACGAGTCGGTGTGTTTGG
27	UL21 268-536_for	<u>AAAAAGCAGGCT</u> CCGCCAGTTCCTGGTGCCCG
28	UL21_rev	<u>AGAAAGCTGGGT</u> CTACACAGACTGTCCGTGTTGG
29	UL10_for	<u>AAAAAGCAGGCT</u> CCGCCATGGGACGCCCGCCCCAGAG
30	UL10ΔC_rev	<u>AGAAAGCTGGGT</u> CTAGGTGCAGCGGAGCACGGCCATGC
31	UL10ΔC-Strep_rev	<u>AGAAAGCTGGGT</u> CTATTTTTGAACTGCGGGTGGCTCCAGCTAGC GGTGCAGCGGAGCACGGC

Nr.	Name	Sequenz (5' → 3')
32	UL10-ER_rev	AGAAAGCTGGGTTTACAGGGACTTCTTACCCAGCGCCCAACGGCGGACGGT
33	UL27_rev	AGAAAGCTGGGTTCTACAGGTCGTCTCGTCGG

### 3.1.6.2 Oligonukleotide für klassische Klonierungen

Erkennungs- und Schnittstellen der entsprechenden Restriktionsenzyme sind kursiv dargestellt.

**Tabelle 3.4: Oligonukleotide für klassische Klonierungen**

Nr.	Name	Sequenz (5' → 3')
34	5'- <i>KpnI</i> -UL10C	TTGGTACCGCGCGCCTATCTGTATC
35	3'- <i>Bam</i> HI-UL10C	TATGGATCCGCCTACCAACGGCGGAC
36	5'- <i>SalI</i> -TM-UL10C	TTGTGACACCAACGGCTACTACG
37	Rluc-CD5L-for	CTTGACCTGCTGGGGATGCTGGTCGCTTCTGCCTCGGACGGCTCATGGCTTCCAAG GTGTACG
38	<i>SacI</i> -Rluc-CD5L-for	TATGAGCTCGCCACCATGCCATGGGGTCTCTGCAACCGCTGGCCACCTGTACCTGC TGGGGATG
39	<i>XhoI</i> -Rluc-rev	TTCTCGAGCCCTGCTCGTTCTCAGCAGC
40	YFP-CD5L-for	CCTTGACCTGCTGGGGATGCTGGTCGCTTCTGCCTCGGACGGCTCATGGTGAGCA AGGGCGAGGAG
41	<i>EcoRI</i> -YFP_rev	TTGAATTCCGGATGAGCATTTCATCAG
42	2nd-CD5L-YFP_for	CATGCCCATGGGGTCTCTGCAACCGCTGGCCACCTGTACCTGCTGGGGATGC
43	<i>XbaI</i> -CD5L_for	TATTCTAGAGGGAGACCATGCCCATGG

### 3.1.6.3 Oligonukleotide für die zielgerichtete Mutagenese

Die zu mutierenden Sequenzbereiche sind fett gedruckt.

**Tabelle 3.5: Oligonukleotide für die zielgerichtete Mutagenese**

Nr.	Name	Sequenz (5' → 3')
44	UL10stop434aa_for	CGACCAAACCGACGTATAGTACGCCAAGATACAACAC
45	UL10stop434aa_rev	GTGTTGTATCTTGGCGTACTATACGTCGGTTTGGTCG
46	UL10stop423aa_for	GGGGAGCCGATTTAGGACGAGGTGGCG
47	UL10stop423aa_rev	CGCCACCTCGTCTAAATCGGCTCCCC
48	UL10stop362aa_for	GCGCATGCGCGACTAGCGACACCGCGCAC
49	UL10stop362aa_rev	GTGCGCGGTGTCGCTAGTCGCGCATGCGC
50	pING-HS_for	CAGCCGGCCAGATCTCCGAGCTCAAGCTTCG
51	pING-HS_rev	CGAAGCTTGAGCTCGGAGATCTGGCCGGCTG

### 3.1.6.4 Oligonukleotide für die BAC-Mutagenese

Die kodierenden Sequenzen von UL10 (gM) sind unterstrichen, Punktmutationen fett dargestellt.

**Tabelle 3.6: Oligonukleotide für die BAC-Mutagenese**

Name	Sequenz (5' → 3')
H5-gM/gk	TCCGCGCTAGCGATACGCTCGACGTGTA <u>CTGTT</u> CGCACTCGTCGTC <u>CCCC</u> ACCTGTTGACA ATTAATCATCGGCA

Name	Sequenz (5' → 3')
H3-gM/gk	CACCACGGTCGGGTAAACACAAACGGTTTATTTAAACGGAACCAAACAGGCCAGTGTTA CAACCAATTAACC
H5-gMΔC	GCGCTAGCGATACGCTCGACGTGTACTGTTTCGCACTCGTCGTCCTCCCAATGGGACGCCGG CCCCAGAG
H3-gMΔC	CACGGTCGGGTAAACACAAACGGTTTATTTAAACGGAACCAAACAGCTAGGTGCAGCGG AGCACGGCCA
H5-ΔgM	GCGCTAGCGATACGCTCGACGTGTACTGTTTCGCACTCGTCGTCCTCCCAATGGGATGACCGG CCCCAGAGGATCTCCCG
H3-ΔgM	CACCACGGTCGGGTAAACACAAACGGTTTATTTAAACGGAACCAAACAGCTACCAACGG CGGACGGTGC

### 3.1.6.5 Oligonukleotide für die Quantifizierung von HSV-1 Genomkopien

Tabelle 3.7: Oligonukleotide für die Quantifizierung von HSV-1 Genomkopien

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

FAM = 5-Carboxyfluorescein, TAMRA = 5-Carboxytetramethylrhodamine

### 3.1.7 Plasmide

#### 3.1.7.1 Gateway-kompatible Leervektoren

Tabelle 3.8: Gateway-kompatible Leervektoren

Nr.	Vektor	Eigenschaften	Herkunft
A	pDONR207	<i>entry</i> -Vektor; Gent <sup>R</sup>	Invitrogen
B	pGBKT7-DEST	Zielvektor; Expressionsvektor in Hefezellen; Kan <sup>R</sup> , TRP1-Gen, N-terminaler Gal4-DNA-Bindedomäne- und <i>c-myc-tag</i>	Laborkollektion
C	pGADT7-DEST	Zielvektor; Expressionsvektor in Hefezellen; Amp <sup>R</sup> , LEU2-Gen, N-terminaler Gal4-Aktivierungsdomäne- und <i>HA-tag</i>	Laborkollektion
D	pCR3-N-HA-DEST	Zielvektor; Expressionsvektor in Säugerzellen; Kan <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , N-terminaler <i>HA-tag</i>	Laborkollektion
E	pCR3-N-c-myc-DEST	Zielvektor; Expressionsvektor in Säugerzellen; Kan <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , N-terminaler <i>c-myc-tag</i>	Laborkollektion
F	pN-YFP-DEST	Zielvektor; Expressionsvektor in Säugerzellen; Amp <sup>R</sup> , N-terminaler <i>YFP-tag</i>	AG Muntau, München
G	pN-Rluc-DEST	Zielvektor; Expressionsvektor in Säugerzellen; Amp <sup>R</sup> , N-terminaler <i>Rluc-tag</i>	AG Muntau, München
-	pN-CD5L-YFP-DEST	Zielvektor; Expressionsvektor in Säugerzellen; Amp <sup>R</sup> , N-terminaler <i>YFP-tag</i> mit vorgelagerter <i>CD5 leader sequence</i>	diese Arbeit (#411)
-	pN-CD5L-Rluc-DEST	Zielvektor; Expressionsvektor in Säugerzellen; Amp <sup>R</sup> , N-terminaler <i>Rluc-tag</i> mit vorgelagerter <i>CD5 leader sequence</i>	diese Arbeit (#355)

### 3.1.7.2 HSV-1 Kollektion

Die laboreigene HSV-1 Kollektion (Fossum *et al.*, 2009; Schmidt, 2009) enthält die meisten HSV-1 Gene entweder in voller Länge (*full length*, FL) oder als Genfragmente im *entry*-Vektor pDONR207 (markiert mit \*A) sowie in den Gateway-kompatiblen Hefevektoren pGBKT7-DEST (markiert mit \*B) und pGADT7-DEST (markiert mit \*C). Alle Inserts besitzen ein Start- und ein Stoppcodon. Einige Gene wurden klassisch kloniert und liegen deshalb in den klassischen Hefevektoren pGBKT7 (markiert mit \*B1) oder pGADT7 (markiert mit \*C1) vor. Als *template* wurde die BAC-DNA pHSV1(17<sup>+</sup>)lox (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Beate Sodeik, MH Hannover) benutzt.

**Tabelle 3.9: HSV-1 Kollektion**

Insert	Größe [bp]	Vektoren	Herkunft
RL1	1-747 (FL)	*B1, C1	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
RL2 Exon 2	58-723 (FL 2328)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL1	1-675 (FL)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL1dSP	58-672 (FL 675)	*A, B, C	diese Studie (PCR mit Oligos 21+22)
UL2	1-1005 (FL)	*A, B, C	Thorsten Stellberger, Karlsruhe
UL3	1-708 (FL)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL4	1-600 (FL)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL5	1-2649 (FL)	*A, B, C	Thorsten Stellberger, Karlsruhe
UL6	1-2031 (FL)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL7	1-891 (FL)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL8	1-2253 (FL)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL9a	1-1200 (FL 2556)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL9b	1201-2553 (FL 2556)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL10	1-1422 (FL)	*A, B, C	Even Fossum, Edinburgh
UL10C	1027-1422 (FL 1422)	*A, B, C	diese Studie (PCR mit Oligos 3+4)
UL11	1-291 (FL)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL12	1-1881 (FL)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL13	1-1557 (FL)	*A, B, C	Even Fossum, Edinburgh
UL14	1-660 (FL)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL15	1-2208 (FL)	*A, B, C	Even Fossum, Edinburgh
UL16	1-1122 (FL)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL17	1-2112 (FL)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL17N	1-1971 (FL 2112)	*A, B, C	diese Studie (PCR mit Oligos 5+6)
UL18	1-957 (FL)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL19	1-4125 (FL)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL20	1-669 (FL)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL20A	1-189 (FL 669)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL21	1-1608 (FL)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg

Insert	Größe [bp]	Vektoren	Herkunft
UL22	1-2517 (FL)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL22NdSP	55-2412 (FL 2517)	*A, B, C	diese Studie (PCR mit Oligos 7+8)
UL23	1-1131 (FL)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL24	1-810 (FL)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL25	1-1743 (FL)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL26	1-1908 (FL)	*A, B,	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL26a	1-1002 ( FL 1908)	*A, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL26b	1003-1905 (FL 1908)	*A, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL26.5	1-990 (FL)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL27NdSP	91-2241 (FL 2715)	*A, B, C	diese Studie (PCR mit Oligos 9+10)
UL27B	2398-2712 (FL 2715)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL28a	1-1011 (FL 2358)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL29a	1-3348 (FL 3591)	*B1, C1	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL30	1-3708 (FL)	*A, B, C	Even Fossum, Edinburgh
UL31	1-921 (FL)	*A, B, C	Even Fossum, Edinburgh
UL32	1-1791 (FL)	*A, B, C	Even Fossum, Edinburgh
UL33	1-393 (FL)	*A, B, C	Even Fossum, Edinburgh
UL34	1-828 (FL)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL34A	1-741 (FL 828)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL35	1-339 (FL)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL36a	1-3000 (FL 9420)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL36b	3001-6000 (FL 9420)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL37d11	34-3372 (FL 3372)	*A, B, C	Thorsten Stellberger, Karlsruhe
UL37b	1501-3372 (FL 3372)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL38	1-1398 (FL)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL39	1-3414 (FL)	*A, B, C	Even Fossum, Edinburgh
UL40	1-1023 (FL)	*A, B, C	Even Fossum, Edinburgh
UL40A	1-537 (FL 1023)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL40B	607-1020 (FL 1023)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL41	1-1470 (FL)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL42	1-1467	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL43	1-1302	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL43A	1-222 (FL 1302)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL43B	643-1095 (FL 1302)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL44	1-1536 (FL)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL44NdSP	70-1431 (FL 1536)	*A, B, C	diese Studie (PCR mit Oligos 11+12)
UL45	1-519 (FL)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL45A	145-516 (FL 519)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL46a	1-1008 (FL 2157)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL46b	1009-2157 (FL 2157)	*A, B, C	Verena Raschbichler, München

Insert	Größe [bp]	Vektoren	Herkunft
UL47	1-2082 (FL)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL48	1-1473 (FL)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL49	1-906 (FL)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL49A-Gen	1-276 (FL)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL49A/A	79-174 (FL 276)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL50	1-1116 (FL)	*A, B, C	Even Fossum, Edinburgh
UL51	1-735 (FL)	*A, B, C	Thorsten Stellberger, Karlsruhe
UL52	1-3177 (FL)	*A, B, C	Verena Raschbichler, München
UL53	1-1017 (FL)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL53A	97-366 (FL 1017)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL54	1-1539 (FL)	*A, B, C	Even Fossum, Edinburgh
UL55	1-561 (FL)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL56	1-705 (FL)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
UL56N	1-630 (FL 705)	*A, B, C	diese Studie (PCR mit Oligos 13+14)
RS1a	265-1161 (FL 3897)	*B1, C1	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
RS1b	1303-3459 (FL 3897)	*B1, C1	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
US1	1-1263 (FL)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
US2	1-876 (FL)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
US3	1-1446 (FL)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
US4	1-717	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
US4A	88-570 (FL 717)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
US5	1-279 (FL)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
US5A	73-150 (FL 279)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
US6	1-1185 (FL)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
US6A	1-1023 (FL 1185)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
US6NdSP	76-1023 (FL 1185)	*A, B, C	diese Studie (PCR mit Oligos 15+16)
US7	1-1173 (FL)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
US7A	1-819 (FL 1173)	*A, B, C	Thorsten Stellberger, Karlsruhe
US7NdSP	61-819 (FL 1173)	*A, B, C	diese Studie (PCR mit Oligos 17+18)
US7B	889-1170 (FL 1173)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
US8	1-1653 (FL)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
US8A	1-1263 (FL 1653)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
US8NdSP	63-126 (FL 1653)	*A, B, C	diese Studie (PCR mit Oligos 19+20)
US8B	1333-1650 (FL 1653)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
US8A-Gen	1-480 (FL)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
US9	1-273 (FL)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
US9A	1-192 (FL 273)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
US10	1-939 (FL)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
US11	1-486 (FL)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg
US12	1-267 (FL)	*A, B, C	Dissertation Tina Schmidt, Homburg

Insert	Größe [bp]	Vektoren	Herkunft
UL21N	1-801 (FL 1608)	*A, B, C	diese Studie (PCR mit Oligos 23+24)
UL21C	802-1608 (FL 1608)	*A, B, C	diese Studie (PCR mit Oligos 25+26)
US6B	1075-1185 (FL 1185)	*A, B, C	diese Studie (PCR mit Oligos 27+28)

### 3.1.7.3 Sonstige Plasmide

Für alle Klonierungen mittels homologer Rekombination (Gateway-Klonierung, siehe auch 3.3.5.6) wurden die Inserts in zwei aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen (*nested* PCR) mit flankierenden *attB*-Sequenzen amplifiziert. Im ersten Schritt wurden die jeweils angegebenen Primerpaare, im zweiten Schritt immer die *attB*-Primer (Oligos 1+2) verwendet.

Tabelle 3.10: Sonstige Plasmide

Nr.	Name	Beschreibung	Herkunft
198	pDONR207-UL10ΔC	Vektor: pDONR207 (A), Insert UL10ΔC (1-1026 bp) PCR mit Oligos 29+30, <i>template</i> : HSV-1 Kollektion	diese Studie
197	pCR3-N-HA-UL10	Vektor: pCR3-N-HA (D), Insert UL10 (1-1422 bp) LR-Reaktion (HSV-1 Kollektion)	diese Studie
199	pCR3-N-HA-UL10ΔC	Vektor: pCR3-N-HA (D), Insert UL10ΔC (1-1026 bp) LR-Reaktion (Plasmid 198)	diese Studie
283	pCR3-N-HA-UL10-s434	Vektor: pCR3-N-HA (D), Insert UL10 (1-1422 bp) As. 434→stopp QuickChange Mutagenese (Oligos 44+45); <i>template</i> : 197	diese Studie
282	pCR3-N-HA-UL10-s423/Δac	Vektor: pCR3-N-HA (D), Insert UL10 (1-1422 bp) As. 423→stopp QuickChange Mutagenese (Oligos 46+47); <i>template</i> : 197	diese Studie
281	pCR3-N-HA-UL10-s362	Vektor: pCR3-N-HA (D), Insert UL10 (1-1422 bp) As. 362→stopp QuickChange Mutagenese (Oligos 48+49); <i>template</i> : 197	diese Studie
357	pDONR207-UL10ΔC-Strep	Vektor: pDONR207 (A), Insert UL10ΔC (1-1031 bp) + Strep- <i>tag</i> PCR mit Oligos 29+31, <i>template</i> : HSV-1 Kollektion	diese Studie
359	pCR3-N-HA-UL10ΔC-Strep	Vektor: pCR3-N-HA (D), Insert UL10ΔC-Strep (1-1031 bp) LR-Reaktion (Plasmid 357)	diese Studie
297	pIN-G	kodiert <i>trafficking</i> -Reporter aus I $\gamma$ k- <i>Leader</i> , HA- <i>tag</i> , EGFP, c-myc- <i>tag</i> und TM-Domäne (McKeown <i>et al.</i> , 2006)	Jens Bosse, München
304	pING-UL10C	Vektor: pIN-G (297), Insert UL10C (1027-1422 bp) KpnI/BamHI, PCR mit Oligos 34+35; <i>template</i> : 199	diese Studie
329	pING-HS-UL10C	Vektor 304, BglII-Verdau und Religation (zur Entfernung von EGFP), QuickChange-Mutagenese zur Behebung eines <i>frameshifts</i> (Oligos 50+51)	diese Studie
332	pING-HS-TM-UL10C	Vektor 329 (ohne EGFP), Insert UL10-TM-C (913-1422 bp) Sall/BamHI (Entfernung von c-myc- <i>tag</i> und TM-Domäne), PCR mit Oligos 36+35; <i>template</i> : 199	diese Studie

Nr.	Name	Beschreibung	Herkunft
426	pDONR207-UL10-ER	Vektor: pDONR207 (A), Insert UL10 (1-1419 bp) + KKEI PCR mit Oligos 29+32, <i>template</i> : HSV-1 Kollektion	diese Studie
427	pCR3-N-c-myc-UL10-ER	Vektor: pCR3-N-c-myc (E), Insert UL10 (1-1419 bp) + KKEI LR-Reaktion (Plasmid 426)	diese Studie
-	pGPS- <i>galk</i> -kan	Vektor: pGPS, Insert: <i>galk</i> -kan-Kassette	Zsolt Ruzsics, München
204	pDonR223-SNF7B	Vektor: pDonR223, Insert: SNF7B (1-672 bp)	<i>MGC</i> ( <i>mammalian gene collection</i> ) (Rual <i>et al.</i> , 2004)
206	pDonR223-ALIX	Vektor: pDonR223, Insert: ALIX (1-2604 bp)	<i>MGC</i>
207	pDonR223-VPS20	Vektor: pDonR223, Insert: VPS20 (1-603 bp)	<i>MGC</i>
208	pDonR223-CHMP1B	Vektor: pDonR223, Insert: CHMP1B (1-597 bp)	<i>MGC</i>
209	pDonR223-CHMP7	Vektor: pDonR223, Insert: CHMP7 (1-1359 bp)	<i>MGC</i>
210	pDonR223-VPS2A	Vektor: pDonR223, Insert: VPS2A (1-666 bp)	<i>MGC</i>
211	pDonR223-CHMP5	Vektor: pDonR223, Insert: CHMP5 (1-657 bp)	<i>MGC</i>
212	pDonR223-STAM1	Vektor: pDonR223, Insert: STAM1 (Fragment 1-1173 bp von 1620 bp)	<i>MGC</i>
213	pDonR223-TSG101	Vektor: pDonR223, Insert: TSG101 (1-1125 bp)	<i>MGC</i>
214	pDonR223-VPS28	Vektor: pDonR223, Insert: VPS28 (1-663 bp)	<i>MGC</i>
215	pDonR223-VPS24	Vektor: pDonR223, Insert: VPS24 (1-666 bp)	<i>MGC</i>
216	pDonR223-VPS22	Vektor: pDonR223, Insert: VPS22 (1-774 bp)	<i>MGC</i>
217	pDonR223-VPS37B	Vektor: pDonR223, Insert: VPS37B (1-855 bp)	<i>MGC</i>
218	pDonR223-VTA1	Vektor: pDonR223, Insert: VTA1 (1-921 bp)	<i>MGC</i>
219	pDonR223-AMSH-LP	Vektor: pDonR223, Insert: AMSH-LP (Fragment 46-1308 bp)	<i>MGC</i>
220	pDonR223-AMSH	Vektor: pDonR223, Insert: AMSH (1-1272 bp)	<i>MGC</i>
222	pDonR223-VPS25	Vektor: pDonR223, Insert: VPS25 (1-528 bp)	<i>MGC</i>
223	pDonR223-STAM2	Vektor: pDonR223, Insert: STAM2 (1-1575 bp)	<i>MGC</i>
224	pDonR223-SNF7A	Vektor: pDonR223, Insert: SNF7A (Fragment 130-795 bp)	<i>MGC</i>
225	pDonR223-VPS4B	Vektor: pDonR223, Insert: VPS4B (1-1332 bp)	<i>MGC</i>
226	pDonR223-VPS4A	Vektor: pDonR223, Insert: VPS4A (1-1311 bp)	<i>MGC</i>
227	pDonR223-VPS37A	Vektor: pDonR223, Insert: VPS37A (1-1191 bp)	<i>MGC</i>
228	pGBKT7-SNF7B	Vektor: pGBKT7 (B), Insert: SNF7B (1-672 bp) LR-Reaktion (Plasmid 204)	Marcus Heinzmann, München
230	pGBKT7-ALIX	Vektor: pGBKT7 (B), Insert: ALIX (1-2604 bp) LR-Reaktion (Plasmid 206)	Marcus Heinzmann, München
231	pGBKT7-VPS20	Vektor: pGBKT7 (B), Insert: VPS20 (1-603 bp) LR-Reaktion (Plasmid 207)	Marcus Heinzmann, München

Nr.	Name	Beschreibung	Herkunft
232	pGBKT7-CHMP1B	Vektor: pGBKT7 (B), Insert: CHMP1B (1-597 bp) LR-Reaktion (Plasmid 208)	Marcus Heinzmann, München
233	pGBKT7-CHMP7	Vektor: pGBKT7 (B), Insert: CHMP7 (1-1359 bp) LR-Reaktion (Plasmid 209)	Marcus Heinzmann, München
234	pGBKT7-VPS2A	Vektor: pGBKT7 (B), Insert: VPS2A (1-666 bp) LR-Reaktion (Plasmid 210)	Marcus Heinzmann, München
235	pGBKT7-CHMP5	Vektor: pGBKT7 (B), Insert: CHMP5 (1-657 bp) LR-Reaktion (Plasmid 211)	Marcus Heinzmann, München
236	pGBKT7-STAM1	Vektor: pGBKT7 (B), Insert: STAM1 (Fragment 1-1173 bp von 1620 bp); LR-Reaktion (Plasmid 212)	Marcus Heinzmann, München
237	pGBKT7-TSG101	Vektor: pGBKT7 (B), Insert: TSG101 (1-1125 bp) LR-Reaktion (Plasmid 213)	Marcus Heinzmann, München
238	pGBKT7-VPS28	Vektor: pGBKT7 (B), Insert: VPS28 (1-663 bp) LR-Reaktion (Plasmid 214)	Marcus Heinzmann, München
239	pGBKT7-VPS24	Vektor: pGBKT7 (B), Insert: VPS24 (1-666 bp) LR-Reaktion (Plasmid 215)	Marcus Heinzmann, München
240	pGBKT7-VPS22	Vektor: pGBKT7 (B), Insert: VPS22 (1-774 bp) LR-Reaktion (Plasmid 216)	Marcus Heinzmann, München
241	pGBKT7-VPS37B	Vektor: pGBKT7 (B), Insert: VPS37B (1-855 bp) LR-Reaktion (Plasmid 217)	Marcus Heinzmann, München
242	pGBKT7-VTA1	Vektor: pGBKT7 (B), Insert: VTA1 (1-921 bp) LR-Reaktion (Plasmid 218)	Marcus Heinzmann, München
243	pGBKT7-AMSH-LP	Vektor: pGBKT7 (B), Insert: AMSH-LP (Fragment 46-1308 bp) LR-Reaktion (Plasmid 219)	Marcus Heinzmann, München
244	pGBKT7-AMSH	Vektor: pGBKT7 (B), Insert: AMSH (1-1272 bp) LR-Reaktion (Plasmid 220)	Marcus Heinzmann, München
246	pGBKT7-VPS25	Vektor: pGBKT7 (B), Insert: VPS25 (1-528 bp) LR-Reaktion (Plasmid 222)	Marcus Heinzmann, München
247	pGBKT7-STAM2	Vektor: pGBKT7 (B), Insert: STAM2 (1-1575 bp) LR-Reaktion (Plasmid 223)	Marcus Heinzmann, München
248	pGBKT7-SNF7A	Vektor: pGBKT7 (B), Insert: SNF7A (Fragment 130-795 bp) LR-Reaktion (Plasmid 224)	Marcus Heinzmann, München

Nr.	Name	Beschreibung	Herkunft
249	pGBKT7-VPS4B	Vektor: pGBKT7 (B), Insert: VPS4B (1-1332 bp) LR-Reaktion (Plasmid 225)	Marcus Heinzmann, München
250	pGBKT7-VPS4A	Vektor: pGBKT7 (B), Insert: VPS4A (1-1311 bp) LR-Reaktion (Plasmid 226)	Marcus Heinzmann, München
251	pGBKT7-VPS37A	Vektor: pGBKT7 (B), Insert: VPS37A (1-1191 bp) LR-Reaktion (Plasmid 227)	Marcus Heinzmann, München
252	pGADT7-SNF7B	Vektor: pGADT7 (C), Insert: SNF7B (1-672 bp) LR-Reaktion (Plasmid 204)	Marcus Heinzmann, München
254	pGADT7-ALIX	Vektor: pGADT7 (C), Insert: ALIX (1-2604 bp) LR-Reaktion (Plasmid 206)	Marcus Heinzmann, München
255	pGADT7-VPS20	Vektor: pGADT7 (C), Insert: VPS20 (1-603 bp) LR-Reaktion (Plasmid 207)	Marcus Heinzmann, München
256	pGADT7-CHMP1B	Vektor: pGADT7 (C), Insert: CHMP1B (1-597 bp) LR-Reaktion (Plasmid 208)	Marcus Heinzmann, München
257	pGADT7-CHMP7	Vektor: pGADT7 (C), Insert: CHMP7 (1-1359 bp) LR-Reaktion (Plasmid 209)	Marcus Heinzmann, München
258	pGADT7-VPS2A	Vektor: pGADT7 (C), Insert: VPS2A (1-666 bp) LR-Reaktion (Plasmid 210)	Marcus Heinzmann, München
259	pGADT7-CHMP5	Vektor: pGADT7 (C), Insert: CHMP5 (1-657 bp) LR-Reaktion (Plasmid 211)	Marcus Heinzmann, München
260	pGADT7-STAM1	Vektor: pGADT7 (C), Insert: STAM1 (Fragment 1-1173 bp von 1620 bp); LR-Reaktion (Plasmid 212)	Marcus Heinzmann, München
261	pGADT7-TSG101	Vektor: pGADT7 (C), Insert: TSG101 (1-1125 bp) LR-Reaktion (Plasmid 213)	Marcus Heinzmann, München
262	pGADT7-VPS28	Vektor: pGADT7 (C), Insert: VPS28 (1-663 bp) LR-Reaktion (Plasmid 214)	Marcus Heinzmann, München
263	pGADT7-VPS24	Vektor: pGADT7 (C), Insert: VPS24 (1-666 bp) LR-Reaktion (Plasmid 215)	Marcus Heinzmann, München
264	pGADT7-VPS22	Vektor: pGADT7 (C), Insert: VPS22 (1-774 bp) LR-Reaktion (Plasmid 216)	Marcus Heinzmann, München
265	pGADT7-VPS37B	Vektor: pGADT7 (C), Insert: VPS37B (1-855 bp) LR-Reaktion (Plasmid 217)	Marcus Heinzmann, München

Nr.	Name	Beschreibung	Herkunft
266	pGADT7-VTA1	Vektor: pGADT7 (C), Insert: VTA1 (1-921 bp) LR-Reaktion (Plasmid 218)	Marcus Heinzmann, München
267	pGADT7-AMSH-LP	Vektor: pGADT7 (C), Insert: AMSH-LP (Fragment 46-1308 bp) LR-Reaktion (Plasmid 219)	Marcus Heinzmann, München
268	pGADT7-AMSH	Vektor: pGADT7 (C), Insert: AMSH (1-1272 bp) LR-Reaktion (Plasmid 220)	Marcus Heinzmann, München
270	pGADT7-VPS25	Vektor: pGADT7 (C), Insert: VPS25 (1-528 bp) LR-Reaktion (Plasmid 222)	Marcus Heinzmann, München
271	pGADT7-STAM2	Vektor: pGADT7 (C), Insert: STAM2 (1-1575 bp) LR-Reaktion (Plasmid 223)	Marcus Heinzmann, München
272	pGADT7-SNF7A	Vektor: pGADT7 (C), Insert: SNF7A (Fragment 130-795 bp) LR-Reaktion (Plasmid 224)	Marcus Heinzmann, München
273	pGADT7-VPS4B	Vektor: pGADT7 (C), Insert: VPS4B (1-1332 bp) LR-Reaktion (Plasmid 225)	Marcus Heinzmann, München
274	pGADT7-VPS4A	Vektor: pGADT7 (C), Insert: VPS4A (1-1311 bp) LR-Reaktion (Plasmid 226)	Marcus Heinzmann, München
275	pGADT7-VPS37A	Vektor: pGADT7 (C), Insert: VPS37A (1-1191 bp) LR-Reaktion (Plasmid 227)	Marcus Heinzmann, München
355	pN-CD5L-Rluc-DEST	Vektor: pN-Rluc-DEST (G), Insert: CD5L 1. PCR mit Oligos 37+39, <i>template</i> : pN-Rluc-DEST 2. PCR mit Oligos 38+39, <i>template</i> : 1. PCR	diese Studie
411	pN-CD5L-YFP-DEST	Vektor: pN-YFP-DEST (F), Insert: CD5L 1. PCR mit Oligos 40+41, <i>template</i> : pN-Rluc-DEST 2. PCR mit Oligos 42+41, <i>template</i> : 1. PCR 3. PCR mit Oligos 43+41, <i>template</i> : 2. PCR	diese Studie
406	pDONR207-UL27dSP	Vektor: pDONR207 (A), Insert UL27dSP (91-2715 bp) PCR mit Oligos 9+33, <i>template</i> : pHSV-1(17 <sup>+</sup> )lox	diese Studie
421	pN-CD5L-Rluc-UL27dSP	Vektor: 355, Insert UL27dSP (91-2715 bp) LR-Reaktion (Plasmid 406)	diese Studie
414	pN-CD5L-YFP-UL27dSP	Vektor: 411, Insert UL27dSP (91-2715 bp) LR-Reaktion (Plasmid 406)	diese Studie
408	pDONR207-US6dSP	Vektor: pDONR207 (A), Insert US6dSP (76-1185 bp) PCR mit Oligos 15+24, <i>template</i> : pHSV-1(17 <sup>+</sup> )lox	diese Studie
423	pN-CD5L-Rluc-US6dSP	Vektor: 355, Insert US6dSP (76-1185 bp) LR-Reaktion (Plasmid 408)	diese Studie
416	pN-CD5L-YFP-US6dSP	Vektor: 411, Insert US6dSP (76-1185 bp) LR-Reaktion (Plasmid 408)	diese Studie

Nr.	Name	Beschreibung	Herkunft
376	pN-YFP-UL45	Vektor: pN-YFP-DEST (F), Insert: UL45 (1-519 bp) LR-Reaktion (HSV-1 Kollektion)	diese Studie
395	pN-Rluc-UL45	Vektor: pN-Rluc-DEST (G), Insert: UL45 (1-519 bp) LR-Reaktion (HSV-1 Kollektion)	diese Studie
372	pN-YFP-UL23	Vektor: pN-YFP-DEST (F), Insert: UL23 (1-1131 bp) LR-Reaktion (HSV-1 Kollektion)	diese Studie
392	pN-Rluc-UL23	Vektor: pN-Rluc-DEST (G), Insert: UL23 (1-1131 bp) LR-Reaktion (HSV-1 Kollektion)	diese Studie
377	pN-YFP-UL26	Vektor: pN-YFP-DEST (F), Insert: UL26 (1-1908 bp) LR-Reaktion (HSV-1 Kollektion)	diese Studie
397	pN-Rluc-UL26	Vektor: pN-Rluc-DEST (G), Insert: UL26 (1-1908 bp) LR-Reaktion (HSV-1 Kollektion)	diese Studie
-	pN-Rluc-Kontrolle	Vektor: pN-Rluc-DEST, Insert: BRET-Kontrolle	AG Muntau, München
-	pN-Rluc-YFP	Vektor: pN-Rluc-DEST, Insert: YFP	AG Muntau, München

## 3.2 Organismen, Säugerzelllinien und Virusstämme

### 3.2.1 Bakterienstämme (*Escherichia coli*)

Tabelle 3.11: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
DB3.1	F- gyrA462 endA1 $\Delta$ (sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(rB-, mB-) supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(SmR) xyl-5 $\lambda$ - leu mtl1	Invitrogen
DH5 $\alpha$	F- $\phi$ 80dlacZM15 (lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(r k-, m k+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 $\lambda$ -	Invitrogen
SW102	F- mcrA $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC) $\phi$ 80dlacZ M15 $\Delta$ lacX74 deoR recA1 endA1 araD139 $\Delta$ (ara, leu) 7649 galU galK rspL nupG [ $\lambda$ c1857 (cro-bioA) $\langle$ >tet]	Warming <i>et al.</i> , 2005

### 3.2.2 Hefestämme (*Saccharomyces cerevisiae*)

Tabelle 3.12: Verwendete Hefestämme

Stamm	Genotyp	Reporter	Transformationsmarker	Referenz
AH109	<b>MAT<math>\alpha</math></b> , trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 $\Delta$ , gal80 $\Delta$ , LYS2::GAL1 <sub>UAS</sub> -GAL1 <sub>TATA</sub> -HIS3, GAL2 <sub>UAS</sub> -GAL2 <sub>TATA</sub> -ADE2, URA3::MEL1 <sub>UAS</sub> -MEL1 <sub>TATA</sub> -lacZ, MEL1	HIS3, ADE2, MEL1, lacZ	trp1, leu2	Clontech
Y187	<b>MAT<math>\alpha</math></b> , ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4 $\Delta$ , met-, gal80 $\Delta$ , MEL1, URA3::GAL1 <sub>UAS</sub> -GAL1 <sub>TATA</sub> -lacZ	MEL1, lacZ	trp1, leu2	Clontech

### 3.2.3 Säugerzelllinien

Tabelle 3.13: Verwendete Säugerzelllinien

Zelllinie	Herkunft	Morphologie	Referenz
HeLa	humane Cervix-Karzinom-Zellen	epithelial, Monolayer	ATCC-Nr. CCL-2
Vero	Nierenzellen der grünen Meerkatze ( <i>Cercopithecus aethiops</i> )	fibroblastenähnlich, Monolayer	ATCC-Nr. CCL-81
HEK293	humane embryonale Nierenzellen	epithelial, Monolayer	ATCC-Nr. CRL-1573

### 3.2.4 Virusstämme

Tabelle 3.14: Verwendete Virusstämme

Virusstamm	Herkunft
HSV-1 F Wildtyp (wt)	Beate Sodeik, Hannover
HSV1(17 <sup>+</sup> )lox	Beate Sodeik, Hannover
HSV-1 ΔgM	BAC-Mutagenese; Melanie Ott, München
HSV-1 gMΔC	BAC-Mutagenese; Melanie Ott, München
HSV-1 gMΔac	BAC-Mutagenese; diese Studie
HSV-1 gMΔC_rev	BAC-Mutagenese; Verena Raschbichler, München

## 3.3 Methoden

### 3.3.1 Bakterienkultur (*Escherichia coli*)

#### 3.3.1.1 Kultivierung und Nährmedien

Die Kultivierung von *E. coli*-Bakterien erfolgte bei 37°C unter konstantem Schütteln in LB-Medium oder auf LB-Agarplatten.

LB-Medium (1 l):

10 g	Bacto Trypton
5 g	Bacto Hefeextrakt
10 g	NaCl

LB-Agar: LB-Medium mit 1,5% (w/v) Bacto Agar

Eine Ausnahme stellen die *E. coli*-Bakterien des SW102-Stammes dar, die bei 32°C und in *low salt* LB-Medium bzw. Agarplatten kultiviert wurden.

*Low salt* LB-Medium (1 l):

10 g	Bacto Trypton
5 g	Bacto Hefeextrakt
4 g	NaCl

Zur Selektion von Plasmid-tragenden Bakterien wurde dem LB-Medium je nach Resistenz Antibiotika in folgenden Konzentrationen zugesetzt:

Ampicillin	100 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml
Gentamycin	15 µg/ml
Chloramphenicol	35 µg/ml

### 3.3.1.2 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Die Kultivierung der Bakterien erfolgte in TYM-Medium bei 37°C im Schüttelinkubator (200 Upm). Zur Herstellung chemisch kompetenter Bakterien wurden zunächst 20 ml Medium mit einem Einzelklon inokuliert und inkubiert, bis eine optische Dichte ( $OD_{600}$ ) von 0,8 erreicht war. Die Bakterienkultur wurde mit 100 ml Medium verdünnt und erneut bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,8 inkubiert. Nach einer nochmaligen Verdünnung der Kultur mit 400 ml Medium erfolgte die Inkubation bis zum Erreichen einer  $OD_{600}$  von 0,6, anschließend wurde die Suspension auf Eiswasser abgekühlt. Alle weiteren Schritte erfolgten bei 4°C oder auf Eis. Die Bakterien wurden in sterilen 250 ml-Zentrifugenbechern in einer Kühlzentrifuge (5 min, 2.500 x g, 4°C) pelletiert und anschließend in 25 ml eiskaltem TfBI-Puffer resuspendiert. Nach 45 min auf Eis wurden die Bakterien erneut pelletiert (10 min, 2.000 x g) und in 25 ml eiskaltem TfBII-Puffer resuspendiert, aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

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

TfBI-Puffer:	30 mM	KAc
	50 mM	MnCl <sub>2</sub>
	100 mM	KCl
	10 mM	CaCl <sub>2</sub>
	15% (v/v)	Glyzerin

TfBII-Puffer:	10 mM	MOPS, pH 7
	75 mM	CaCl <sub>2</sub>
	10 mM	KCl
	15% (v/v)	Glyzerin

### 3.3.1.3 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

100 µl kompetente Bakterien wurden mit der zu transformierenden DNA (5 µl eines Rekombinationsansatzes, 1 µl einer Mini-Präparation und 20 µl eines Ligationsansatzes) 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock (1 min, 42°C) und erneute Inkubation auf Eis (10 min). Nach Zugabe von 500 µl LB-Medium wurden die Bakterien 1 h bei 37°C geschüttelt, danach auf LB-

Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsmedium ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 3.3.1.4 Herstellung elektro- und rekombinationskompetenter SW102-Bakterien

Dieser *E.coli*-Stamm wurde für die homologe Rekombination zur BAC-Mutagenese verwendet und zeichnet sich durch den Besitz eines integrierten, defekten und temperatur-sensitiven Prophagen  $\lambda$  aus, der für homologe Rekombinationsfaktoren kodiert (siehe 3.3.4.6). Die Kultivierung erfolgte bei 32°C, die Induktion der Rekombinationsgene wurde durch einen Hitzeschock bei 42°C (15 min unter Schütteln im Wasserbad) erreicht. Zur Herstellung elektro- und rekombinationskompetenter SW102-Bakterien wurden 50 ml LB-Medium (*low salt*) mit einer Übernachtskultur inokuliert und bei 32°C und 150 rpm inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,5 erreicht war. Nach der Induktion der Rekombinationsgene wurden die Zellen auf Eis abgekühlt und in einer Kühlzentrifuge (5 min, 12.400 x g, 4°C) pelletiert. Nach zweimaliger Resuspension in eiskaltem H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> und erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 70µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> aufgenommen und zur Elektroporation eingesetzt (Biorad Gene Pulser Xcell; Programm 2: *E. coli*, 2mm, 2,5 kV).

### 3.3.2 Hefekultur (*Saccharomyces cerevisiae*)

#### 3.3.2.1 Kultivierung und Nährmedien

Die Kultivierung von *S. cerevisiae* erfolgte bei 30°C auf Agarplatten oder im Schüttelinkubator in folgenden Medien.

YPD-Medium (1 l):	20 g	Bacto Trypton
	10 g	Bacto Hefeextrakt
	20 g	Glukose

YPD-Agar:	YPD-Medium mit 3% (w/v) Bacto Agar
-----------	------------------------------------

Zur Selektion Plasmid-tragender Hefezellen bzw. zur Überprüfung von Reporter-genaktivität wurden sogenannte *Dropout*-Medien verwendet.

SD-LW (1 l):	26,7 g	Minimal SD Base
	0,64 g	-Leu/-Trp DO Supplement

SD-L (1 l):	26,7 g	Minimal SD Base
	0,64 g	-Leu/-Trp DO Supplement
	20 mg	L-Tryptophan

SD-W (1 l):	26,7 g	Minimal SD Base
	0,64 g	-Leu/-Trp DO Supplement
	100 mg	L-Leucin

SD-LWH (1 l):	26,7 g	Minimal SD Base
	0,6 g	-Ade/-His/-Leu/-Trp DO Supplement
	20 mg	L-Adenin

Selektions-Agar: *Dropout*-Medium mit 3% (w/v) Bacto Agar

### 3.3.2.2 Herstellung chemisch kompetenter Hefezellen

Die Kultivierung der Hefezellen erfolgte in YPD-Medium bei 30°C im Inkubationsschüttler. Mit Hilfe von Vorkulturen wurden 25 ml YPD-Medium mit dem gewünschten Hefestamm inokuliert ( $OD_{600}$  von 0,1) und bis zum Erreichen einer  $OD_{600}$  von 0,6 inkubiert (ca. 4-5 h). Die Kultur wurde in 50-ml Falconröhrchen überführt und die Hefezellen in einer Kühlzentrifuge (5 min, 930 x g, 4°C) pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in 12,5 ml SBEG-Lösung resuspendiert und erneut sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 500 µl SBEG-Lösung aufgenommen, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

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

### 3.3.2.3 Transformation chemisch kompetenter Hefezellen

100 µl kompetente Hefezellen des gewünschten Stammes wurden mit 1 µg der zu transformierenden DNA gemischt und nach Zugabe von 750 µl PEG/Bicin-Lösung 1 h bei 30°C inkubiert. Nach einem 5-minütigen Hitzeschock von 45°C wurden die Zellen in einer Tischzentrifuge pelletiert (5 min, 2.700 x g), in 1 ml NB-Puffer aufgenommen und erneut sedimentiert. 800 µl des Überstandes wurden verworfen, die Hefezellen im restlichen NB-Puffer aufgenommen, auf Agarplatten mit entsprechendem Selektionsmedium ausgestrichen und 3 Tage bei 30°C inkubiert.

PEG/Bicin-Lösung:	40% (w/v)	PEG 1000
	200 mM	Bicin, pH 8,35

NB-Puffer:	150 mM	NaCl
	10 mM	Bicin, pH 8,35

## 3.3.3 Gewebekultur von Säugerzellen

### 3.3.3.1 Kultivierung und Kryo-Konservierung

Alle verwendeten Säugerzelllinien wurden in DMEM mit 10% FCS und 1% Pen/Strep-Lösung bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in feuchter Atmosphäre kultiviert, zum Passagieren wurde 1x Trypsin/EDTA (0,05%) verwendet. Zur Kryo-Konservierung wurden die Zellen einer konfluenten 10-cm-Zellkulturschale pelletiert (5 min, 300 x g) und in 0,5 ml eiskaltem DMEM mit 40% FCS resuspendiert. Anschließend wurde unter Schütteln tropfenweise 0,5 ml DMEM mit 20% DMSO zugegeben. Die Zellsuspension

wurde sofort in ein eisgekühltes Kryo-Röhrchen überführt, über Nacht auf  $-80^{\circ}\text{C}$  abgekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen der Zellen wurde die tiefgefrorene Zellsuspension in einem  $37^{\circ}\text{C}$  warmen Wasserbad erwärmt, mit dem 10-fachen Volumen Zellkulturmedium gewaschen und in Kultur genommen.

### 3.3.3.2 DNA-Transfektion

Für die Transfektion von HeLa oder Vero-Zellen mit Plasmid-DNA wurde standardmäßig das Effectene Transfektionsreagenz (Qiagen) nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

Um Vero-Zellen mit BAC-DNA zu transfizieren, wurde Lipofectamine 2000 (Invitrogen) ebenfalls nach Angaben des Herstellers benutzt.

Für das BRET-System im 96-*well*-Format wurde die Nucleofection (Lonza) der HEK293-Zellen nach Protokoll des Herstellers (Amaxa 96-*well* Shuttle Protocol for HEK-293) mit dem Nucleofector 96-*well* Shuttle System (Programm DS-130) verwendet.

### 3.3.4 Virologische Methoden

#### 3.3.4.1 Vermehrung der Virusstämme

Zur Vermehrung der Virusstämme wurden Vero-Zellen in 15-cm-Zellkulturschalen bis zur Subkonfluenz kultiviert und anschließend mit dem jeweiligen Virusstamm und einer MOI von 0,02 infiziert. Nach ca. 3 Tagen, wenn die lytische Infektion die meisten Zellen erfasst hatte, wurde der Überstand geerntet und zur Lyse noch vorhandener Zellen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gefroren und erneut aufgetaut. Um Zelltrümmer zu sedimentieren, wurde die Suspension zentrifugiert (10 min,  $850 \times g$ ), der virushaltige Überstand anschließend in Kryo-Röhrchen aliquotiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 3.3.4.2 HSV-1-Infektion von Säugierzellen

Subkonfluente Kulturen von HeLa- oder Verozellen wurden mit dem gewünschten HSV-1-Virusstamm inokuliert bzw. zur Kontrolle (*mock*) mit virusfreiem Medium versetzt und 1 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  unter gelegentlichem Bewegen inkubiert. Anschließend wurden alle nicht-adsorbierten Viren durch Waschen des Zellmonolayers mit PBS und Gabe frischen Zellkulturmediums entfernt und die Zellen bis zur weiteren Analyse unter Standardbedingungen inkubiert. Das Maß der für die Infektion verwendeten infektiösen Partikel ist die sog. *multiplicity of infection* (MOI), die die Zahl infektiöser Partikel pro Zelle angibt.

#### 3.3.4.3 Plaque-Assay zur Bestimmung des Virustiters

Der *Plaque Assay* wurde angewendet, um die Menge an infektiösen Partikeln in einer Probe zu bestimmen. Am Vortag wurden Vero-Zellen in 24-*well*-Schalen ausgesät, so dass am Folgetag

Konfluenz erreicht war ( $8 \times 10^4$  Zellen pro *well*). Serielle 10-fache Verdünnungen (in DMEM) der virushaltigen Probe wurden hergestellt und in Triplikaten mit den Vero-Zellen 1h unter Standardbedingungen inkubiert. Nach Entfernen des Inokulums wurde der Zellmonolayer mit PBS gewaschen, mit Methylcellulose-haltigem Medium überschichtet und 3 Tage inkubiert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Die Methylcellulose bewirkt, dass sich die von einer infizierten Zelle neu gebildeten Viruspartikel nur lokal ausbreiten und damit *Plaques* entstehen. Um diese sichtbar zu machen, wurden die Zellen mit Kristallviolett-Lösung fixiert und gleichzeitig gefärbt. Durch Auszählen der entstandenen *Plaques* und unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnung und des Inokulumvolumens konnte so die Zahl infektiöser Partikel als *plaque forming units* (pfu) pro ml und somit der Virustiter der Probe bestimmt werden.

Methylcellulose-Medium (0,5 l):	3,75 g	Carboxymethylcellulose
	25 ml	FCS
	50 ml	10x MEM
	5 ml	Glutamin-Lösung
	2,5 ml	100x Nichtessenzielle Aminosäuren (NEAA)
	5 ml	Pen/Strep-Lösung
	24,7 ml	NaHCO <sub>3</sub>

Kristallviolett-Lösung:	0,2% (w/v)	Kristallviolett
	11% (v/v)	Formaldehyd
	2% (v/v)	Ethanol
	2% (w/v)	Paraformaldehyd

#### 3.3.4.4 Kinetik der HSV-1 Replikation (*one-step growth kinetics*)

Um das Replikationsverhalten der verschiedenen Virusstämme zu charakterisieren und zu vergleichen, wurden sogenannte *one-step* Virus-Wachstumskurven angefertigt. Dazu wurden Vero-Zellen in 12-*well*-Schalen ausgesät ( $1,5 \times 10^5$  Zellen/*well*) und am nächsten Tag mit dem entsprechenden Virusstamm und der angegebenen MOI infiziert (siehe 3.3.4.2). Anschließend wurde in regelmäßigen Abständen der Kulturüberstand eines *well*s (1 ml) zur Bestimmung der extrazellulären Viruspartikel bei -80°C tiefgefroren. Nach Auftauen im Wasserbad (37°C) und Sedimentation von Zelltrümmern (30 s, 13.000 x g) wurden die Proben zur quantitativen Bestimmung infektiöser Partikel mittels *Plaque Assays* eingesetzt (siehe 3.3.4.3).

#### 3.3.4.5 *Realtime* PCR-Quantifizierung von HSV-1 Genomkopien mittels *TaqMan*<sup>TM</sup>-PCR (qRT-PCR)

Virale DNA wurde aus Proben zur Bestimmung der Replikationskinetik (siehe 3.3.4.4) mit Hilfe des High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche) extrahiert und mittels *TaqMan*<sup>TM</sup> Polymerasekettenreaktion (PCR) quantifiziert. Die Durchführung der *TaqMan*<sup>TM</sup>-PCR erfolgte im ABI Prism 7000 Sequence

Detection System (Applied Biosystems) mit HSV-1 spezifischen Primern und Sonde. Die Daten wurden mit der ABI Prism 7000 Software (Applied Biosystems) analysiert und die Anzahl der viralen Genomkopien dabei relativ zu einem HSV-1 Standard (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der klinischen Virologie, M. v. Pettenkofer-Institut) bestimmt.

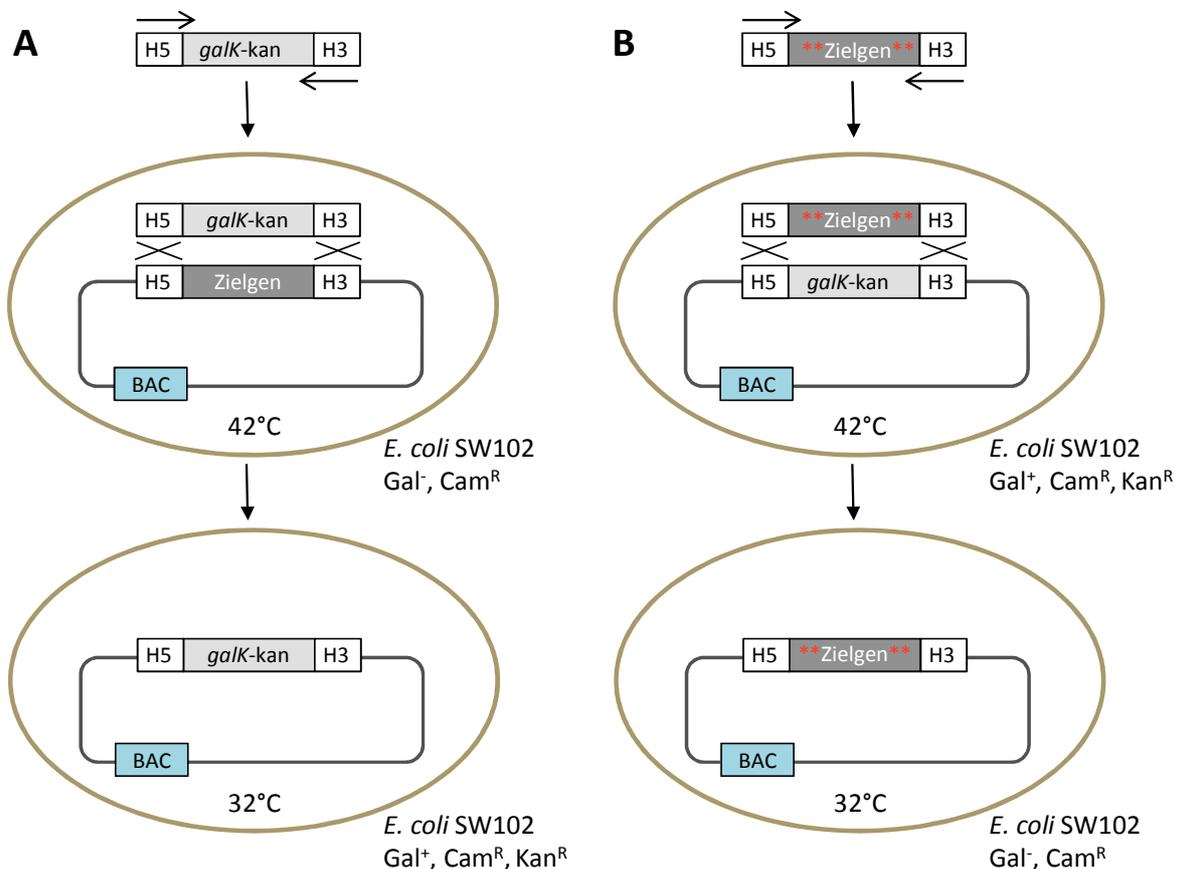
Reaktionsansatz:	15 µl	TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2x)
	0,9 µl	HSV-1 Primer 1
	0,9 µl	HSV-1 Primer 2
	0,9 µl	HSV-1 Sonde
	7,3 µl	Ampuwa
Programm:	50°C	2 min
	95°C	10 min
	95°C	15 sec
	60°C	1 min
		} 45x

### 3.3.4.6 BAC-Mutagenese

Die BAC-Mutagenese nach einer modifizierten *galk* Positiv-/Gegenselektionsmethode (Ott *et al.*, 2011) ermöglicht es, spezifische und zielgerichtete Mutationen in das HSV-1 Genom einzuführen. Das dazu verwendete *bacterial artificial chromosome* (BAC) pHSV1(17<sup>+</sup>)lox besitzt anstelle des nicht-essenziellen Gens UL23 die bakterielle BAC-Kassette zusammen mit der Sequenz der Cre-Rekombinase (Nagel *et al.*, 2008). Diese Kassette wird flankiert von *loxP*-Sequenzen, den Erkennungsstellen der Cre-Rekombinase. Nach der Transfektion in eukaryotische Zellen wird durch die Expression der Cre-Rekombinase die BAC-Kassette wieder entfernt.

Zur BAC-Mutagenese wurde zunächst das zu verändernde Gen mit Hilfe homologer Rekombination durch eine *galk*-kan Kassette (*gk*) ersetzt, die für Galaktokinase und Kanamycin-Resistenz kodiert. Zu diesem Zweck wurde die Selektionskassette mit Vektor pGPS-*galk*-kan (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Zsolt Ruzsics, LMU München) als *template* so amplifiziert, dass ein PCR-Produkt mit flankierenden homologen Bereichen von ca. 50 bp Länge zum Zielgen entsteht (siehe 3.3.5.4). Durch den DNA-Verdau mit *DpnI* wurde das Ursprungsplasmid entfernt (siehe 3.3.5.7). Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde mittels Elektroporation in elektro- und rekombinationskompetente SW102-Bakterien (*E. coli*), die das pHSV1(17<sup>+</sup>)lox tragen, transformiert (Melanie Ott, LMU München). Dieser von DH10B-abstammende *E. coli*-Stamm enthält einen integrierten, defekten und temperatur-sensitiven Prophagen  $\lambda$ , der für die homologen Rekombinationsfaktoren *gam*, *exo* und *bet* kodiert, und wird bei 32°C kultiviert (Warming *et al.*, 2005). Durch einen kurzen Hitzeschock werden die Rekombinationsgene induziert, so dass die homologe Rekombination erfolgen kann (siehe 3.3.1.4). Die transformierten SW102-Zellen wurden auf LB-Agarplatten mit Chloramphenicol und Kanamycin

24 h bei 32°C inkubiert (siehe 3.3.1.1). Anschließend erfolgte der Transfer von Einzelkolonien auf McConkey-Agar mit 1% Galaktose und nachfolgender Inkubation bei 32°C für weitere zwei Tage. Dieser Schritt dient der Selektion von Bakterienzellen, in denen die homologe Rekombination und damit das Einsetzen der *gk*-Kassette in pHSV1(17<sup>+</sup>)lox erfolgreich waren. Da der SW102-Stamm selbst keine funktionelle Galaktokinase kodiert, können nur solchen Zellen auf Minimalmedium mit Galaktose als Kohlenstoffquelle wachsen, bei denen die *galk*-Funktion *in trans* komplementiert wird. Dieser Schritt der BAC-Mutagenese wird demnach als Positivselektion bezeichnet. Durch einen Farbindikator des McConkey-Agars färben sich Einzelkolonien, die Galaktose verwerten können, rot. Zur Kontrolle wurde die BAC-DNA roter Kolonien isoliert (Mini-Präparation, siehe 3.3.5.2) und mittels Restriktionsverdau auf Insertion der *gk*-Kassette überprüft (siehe 3.3.5.5).



**Abbildung 3.1: Prinzip der BAC-Mutagenese**

(A) Im ersten Schritt der BAC-Mutagenese wird die *galk-kan*-Kassette (*gk*) über flankierende homologe Bereiche mit der Zielsequenz im BAC pHSV1(17<sup>+</sup>)lox ausgetauscht. Die homologe Rekombination erfolgt in SW102-Zellen und wird durch die Induktion des inserierten, temperatur-sensitiven Prophagen  $\lambda$  bei 42°C erreicht. Die Positivselektion erfolgt über die Resistenz gegen Kanamycin und Chloramphenicol sowie das Wachstum auf Minimalmedium mit Galaktose als Kohlenstoffquelle.

(B) Der Austausch der *gk*-Kassette gegen eine mutierte Sequenz des Zielgens erfolgt im zweiten Schritt ebenfalls über homologe Rekombination in SW102-Zellen wie oben beschrieben. Die Negativselektion von Bakterien mit rekombinanter BAC-DNA erreicht man durch Verwendung von Minimalmedium mit 2-Deoxy-Galaktose (DOG) und Glycerin.

Als nächster Schritt erfolgte die Negativselektion, bei dem die *gk*-Kassette durch ein Fragment mit der gewünschten Mutation ersetzt wurde. Analog wie oben beschrieben, wurde das entsprechende PCR-Fragment mit flankierenden homologen Bereichen zur *gk*-Kassette amplifiziert und in elektro- und rekombinationskompetente SW102-Bakterien transformiert, die das pHSV1(17<sup>+</sup>)lox mit inserierter *gk*-Kassette trugen. Um Bakterien zu erhalten, die nur eine Kopie der BAC-DNA mit gewünschter Rekombination besitzen, folgte zunächst eine längere Wachstumsperiode der transformierten Bakterien ohne Selektionsdruck in 10 ml *low salt* LB-Medium (4,5 h, 32°C, 150 rpm). Anschließend wurde 1 ml der Kultur zentrifugiert (20.000 x g, 30 s), das Bakterienpellet zweimal mit PBS gewaschen und in Verdünnungen (1:10 bzw. 1:100) auf M63-Minimalnährböden mit 0,2% Glycerin und 2-Deoxy-Galaktose (DOG) bei 32°C inkubiert (3 d). Das DOG dient hierbei der negativen Selektion gegen *gk*, da es durch eine funktionale Galaktokinase in ein toxisches, für Bakterien nicht verwertbares Zwischenprodukt umgewandelt wird (2-Deoxy-Galaktose-1-Phosphat). Folglich sind nur solche Bakterien mit erfolgreicher Rekombination und damit dem Verlust der *gk*-Kassette resistent gegenüber DOG. Diese DOG-resistenten Einzelkolonien wurden auf McConkey-Agar mit 1% Galaktose übertragen und erneut 2 d bei 32°C inkubiert. Auf Grund ihres Verlustes der Galaktose-Verwertung besitzen Bakterienkolonien mit erfolgreicher zweiter Rekombination eine weiße Farbe. Die BAC-DNA wurde nach Isolierung (Midi-Präparation, siehe 3.3.5.2) mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft. Durch Transfektion der BAC-DNA in Vero-Zellen wurde das mutante Virus rekonstituiert (siehe 3.3.3.2).

McConkey-Agarplatten	10 g	McConkey-Agar
	225 ml	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>
Autoklavieren, auf 50°C abkühlen lassen und hinzufügen:		
	25 ml	Galaktose (10%)
	25 µg/ml	Chloramphenicol

M63 Minimalmedium	4 g	Agar
	200 ml	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>
Autoklavieren, auf 50°C abkühlen lassen und hinzufügen:		
	50 ml	5 x M63 Salz
	0,5 ml	MgSO <sub>4</sub> (1 M)
	1,25 ml	D-Biotin (0,2 mg/ml)
	1,1 ml	L-Leucin (10 mg/ml)
	5 ml	Glycerin (10%)
	5 ml	2-Deoxy-Galaktose (DOG) (10%)
	25 µg/ml	Chloramphenicol

5 x M63 Salz (1 l)	10 g	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	68 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	2,5 mg	Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> · 7 H <sub>2</sub> O
	pH 7,0 mit KOH einstellen	

### 3.3.5 Molekularbiologische Methoden

#### 3.3.5.1 Plasmid-DNA-Isolierung aus *E. coli*-Bakterien (Mini-Präparation)

Plasmid-DNA aus *E. coli*-Bakterien wurde mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die DNA-Isolierung erfolgt dabei nach alkalischer Lyse der Bakterien durch die Bindung an eine Silica-Matrix, gefolgt von Reinigung und Elution.

#### 3.3.5.2 BAC-DNA-Isolierung aus *E. coli*-Bakterien

Die Isolierung von BAC-DNA aus *E. coli*-Zellen wurde je nach Bedarf entweder als Mini- oder als Midi-Präparation bewerkstelligt. Für die Mini-Präparation wurden 10 ml einer Übernachtskultur pelletiert (15 min, 1.300 x g) und die alkalische Lyse der Bakterienzellen mit den Puffern 1-3 aus dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach Sedimentation der Zelltrümmer (20.000 x g, 5 min) wurde der wässrige Überstand in einem frischen 2-ml-Reaktionsgefäß mit 1 ml Phenol-Chloroform gemischt und erneut zentrifugiert. Die nach der Phasentrennung entstandene obere Phase wurde in einem frischen 2-ml-Reaktionsgefäß mit 1 ml Isopropanol gemischt, um die enthaltene DNA zu fällen und durch Zentrifugation zu pelletieren. Das DNA-Pellet wurde mit 70%-igem Ethanol gewaschen und anschließend bei RT getrocknet. Danach wurde es in 90 µl TE-Puffer (pH 8.0) im Thermoschüttler (37°C, 15 min, 300 rpm) gelöst.

Zur Präparation von BAC-DNA in einem größeren Ansatz (250 ml Übernachtskultur) wurde das NucleoBond Xtra Midi Kit (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers verwendet und die BAC-DNA anschließend in 150 µl TE-Puffer (pH 8.0) über Nacht bei 4°C gelöst.

1x TE-Puffer (1 l):	1,21 g	Tris
	2 ml	0,5 M EDTA pH 8

#### 3.3.5.3 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Messung von Konzentration und Reinheit einer DNA-Lösung erfolgte mit Hilfe eines Nanodrop ND-1000 Spektrophotometers (Peqlab). Da das Absorptionsmaximum von DNA und RNA bei 260 nm, das von Proteinen bei 280 nm liegt, kann aus der optischen Dichte OD<sub>260</sub> die DNA-Konzentration und aus dem Quotienten OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> die Reinheit der Lösung bestimmt werden. Dabei entspricht 1 OD<sub>260</sub> 50 µg/ml dsDNA bzw. 40 µg/ml RNA, während der optimale Reinheitsquotient bei 1,8 liegt.

### 3.3.5.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde das HotStar High Fidelity Polymerase Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers benutzt. Für die Rekombinationsklonierungen wurden die *attB*-Sequenzen in einer zweistufigen *nested* PCR an die DNA-Fragmente angefügt. Nach Auftrennung mittels Agarose-Gelelektrophorese wurden die DNA-Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) aufgereinigt.

### 3.3.5.5 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese

Die horizontale Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Molekulargewicht-abhängigen Auftrennung von DNA-Fragmenten eingesetzt. Dazu wurden in der Regel 1%-ige Agarosegele in 1 x TAE-Puffer hergestellt und mit 0,25 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die aufzutrennenden DNA-Proben wurden mit der entsprechenden Menge 6 x DNA-Probenpuffer gemischt und im Agarosegel im elektrischen Feld (1 x TAE-Puffer, 120 V) aufgetrennt. Zum Größenvergleich wurde ein Molekulargewichtsstandard (Gene Ruler 1kb DNA Ladder, Fermentas) benutzt. Die Ethidiumbromid-gefärbten DNA-Banden wurden im Anschluss mittels UV-Licht ( $\lambda = 302 \text{ nm}$ ) sichtbar gemacht.

Die Analyse von BAC-DNA-Fragmenten erfolgte in besonders langen 0,8%-igen Agarosegelen, die mit 1x TBE-Puffer angesetzt wurden. Die Auftrennung der DNA-Proben im elektrischen Feld erfolgte über 18 h bei 60 V ebenfalls in 1x TBE-Puffer.

6x DNA-Probenpuffer:	0,25% (w/v)	Bromphenolblau
	0,25% (w/v)	Xylencyanol
	40% (v/v)	Glyzerin

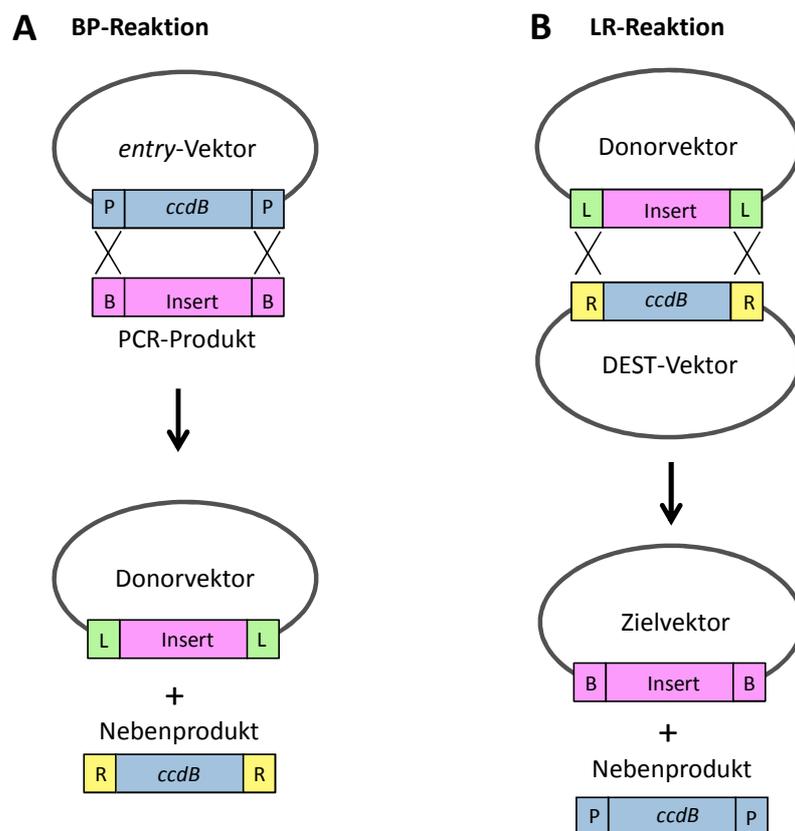
1x TAE-Puffer (1l):	4,84 g	Tris
	1,14 ml	Essigsäure
	2 ml	0,5 M EDTA pH 8

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

### 3.3.5.6 Klonierung mittels homologer Rekombination (Gateway-Klonierung)

Die Gateway-Klonierung (Invitrogen) beruht auf dem sequenzspezifischen Rekombinationssystem des Phagen  $\lambda$ . Mittels *nested* PCR werden DNA-Fragmente (sogenannte Inserts) amplifiziert, die von spezifischen Rekombinationssequenzen (*attachment sites*, *attB1* und *attB2*) flankiert werden. Diese können über homologe Rekombination mit Hilfe des BP-Clonase II Mix (Invitrogen) in sogenannte *entry*-Vektoren (z.B. pDONR207) inseriert werden. Diese *entry*-Vektoren besitzen ein toxisches Selbstmordgen (*ccdB*-Domäne), das an beiden Enden *attP*-Rekombinationssequenzen trägt. Die BP-

Reaktion sorgt also für den Austausch der *ccdB*-Domäne gegen das gewünschte Insert, das nun im sogenannten Donorvektor von *attL*-Sequenzen flankiert wird. In einem zweiten Schritt kann nun das Insert mit den Enzymen des LR-Clonase II Mix (Invitrogen) in jeden beliebigen Zielvektor (DEST-Vektor), der über *attR*-Sequenzen verfügt, übertragen werden. Auch hier erfolgt die Selektion über die *ccdB*-Domäne, die durch das gewünschte Insert ersetzt wird und so das Wachstum transformierter DH5 $\alpha$ -Zellen ermöglicht. Die Durchführung der Klonierung erfolgte nach Angaben des Herstellers.



**Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Gateway-Klonierung**

(A) Ein PCR-Fragment mit flankierenden *attB*-Sequenzen wird über homologe Rekombination zwischen *attB*- und *attP*-sites mittels BP-Clonase in einen *entry*-Vektor überführt. Die Selektion erfolgt über den Verlust der toxischen *ccdB*-Domäne und Antibiotika-Resistenzen. (B) Über die LR-Reaktion kann das Insert leicht in jeden beliebigen Gateway-kompatiblen DEST-Vektor überführt werden. Die homologe Rekombination erfolgt zwischen den flankierenden *attL*-sites des Inserts und den *attR*-Sequenzen im DEST-Vektor.

### 3.3.5.7 DNA-Restriktionsverdau

Das Schneiden von DNA mit sequenzspezifischen Restriktionsendonukleasen kann entweder bei der sogenannten klassischen Klonierung (Ligation von DNA-Fragmenten) oder zur Überprüfung des Klonierungserfolgs eingesetzt werden. Alle Restriktionsenzyme und Puffer wurden von NEB bezogen und nach Angaben des Herstellers eingesetzt. In der Regel wurden ca. 1,5  $\mu$ g DNA bei der

empfohlenen Temperatur mit 6 U Enzym 1 h lang verdaut und anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

#### **3.3.5.8 Ligation von DNA-Fragmenten**

Bei der sogenannten klassischen Klonierung werden DNA-Fragmente (Inserts) zielgerichtet in Vektoren inseriert. Dies setzt den Verdau sowohl des Inserts als auch des Zielvektors mit einem Paar von Restriktionsendonukleasen voraus, damit eine Ligation der kompatiblen Enden stattfinden kann. Für diese Arbeit wurde die T4 DNA-Ligase des Quick Ligation Kits (NEB) nach Angaben des Herstellers verwendet. Der Ligationsansatz wurde anschließend in kompetente DH5 $\alpha$ -Zellen transformiert.

#### **3.3.5.9 Sequenzierung von DNA**

Die Sequenz klonierter Plasmide wurde durch Sequenzierung der Firma GATC (Koblenz) auf ihre Richtigkeit überprüft. Die Sequenzierung der HSV-1 BAC-DNA wurde von der Firma sequiserve (Vaterstetten) durchgeführt.

#### **3.3.5.10 Zielgerichtete Mutagenese**

Die zielgerichtete Mutagenese von Plasmiden dient der Einführung von Punktmutationen oder dem Austausch weniger Basenpaare. Dazu 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 kompetente DH5 $\alpha$ -Zellen.

### **3.3.6 Biochemische Methoden**

#### **3.3.6.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot**

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Molekulargewicht-abhängigen Auftrennung von negativ beladenen Proteinen im elektrischen Feld, der anschließende Transfer auf eine Nitrocellulosemembran wird als Western Blot (WB) bezeichnet. Zur Herstellung des Zelllysats wurden pelletierte HeLa- oder Verozellen eines 12-wells in 150  $\mu$ l 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei RT lysiert. Auf das Aufkochen der Probe wurde in dieser Studie verzichtet, um eine Aggregatbildung der Membranproteine zu vermeiden. Es wurden diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgele gegossen, die aus einem 10%-igen Trenngel und einem 5%-igen Sammelgel bestanden. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei 100 V und 20 mA für 90 min, zum Größenvergleich wurde ein Molekulargewichtsstandard verwendet (Benchmark Protein Ladder, Invitrogen). Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine mittels Nasstransfer auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (100 V, 250 mA, 60 min). Durch Färbung der Membran mit einer

Ponceaurot-Lösung wurde der Transfererfolg überprüft und die Banden des Molekulargewichtsstandards angezeichnet. Nach Entfärbung in 1x TBST-T wurden unspezifische Bindestellen durch 30-minütige Inkubation in 5% Milchpulver/TBS-T auf dem Kippschüttler gesättigt. Die Inkubation mit dem spezifischen Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C ebenfalls auf dem Kippschüttler und in 5%-iger Milchlösung. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T (5 min) wurde die Membran mit dem entsprechenden Peroxidase-gekoppelten (*horseradish peroxidase* = Pox) Sekundärantikörper 3 h bei Raumtemperatur in 5% Milchpulver/TBS-T inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die spezifisch markierten Proteinbanden durch die enzymatische Reaktion der Pox mit dem ECL-System (*enhanced chemiluminescence*, GE Healthcare) auf einem Röntgenfilm (Agfa) sichtbar gemacht.

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

Sammelgel (5%):	1,25 ml	0,5 M Tris-HCl pH 6,5
	830 µl	Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)
	50 µl	SDS-Lösung (10% (w/v))
	2,8 ml	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>
	35 µl	APS (10% (w/v))
	35 µl	TEMED

4x SDS-Probenpuffer:	130 mM	0,5 M Tris-HCl pH 6,8
	4% (w/v)	SDS
	20% (v/v)	Glyzerin
	0,02% (w/v)	Bromphenolblau
	100 mM	DTT

1x Laufpuffer (1l):	1 g	SDS
	3,03 g	Tris
	14,4 g	Glyzin

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

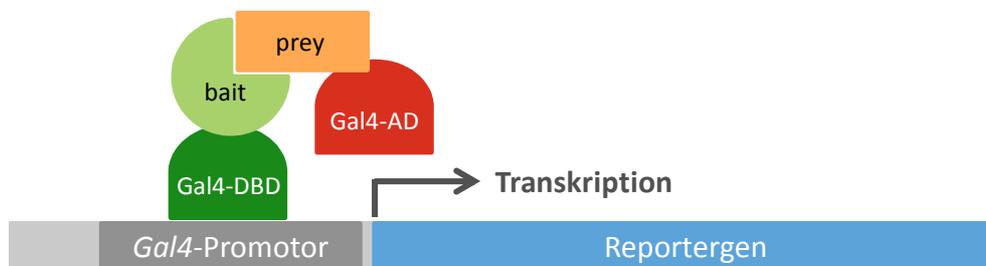
Ponceaurot-Lösung:	0,1% (w/v)	Ponceau S
	5% (v/v)	Essigsäure

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

### 3.3.7 Methoden zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen

#### 3.3.7.1 Hefe-2-Hybridsystem (*Yeast-2-Hybrid*, Y2H)

Das Hefe-2-Hybridsystem (Y2H) wird zur Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen unter *in-vivo*-ähnlichen Bedingungen benutzt (siehe Abbildung 3.3). Das System beruht auf dem Transkriptionsfaktor Gal4 der Hefe, der sich aus einer DNA-bindenden Domäne (DBD) und einer Aktivierungsdomäne (AD) zusammensetzt (Fields und Song, 1989). Diese zwei verschiedenen Funktionen des Transkriptionsfaktors macht man sich im Y2H-System zunutze, indem man zwei potenzielle Interaktionspartner jeweils fusioniert an die beiden Gal4-Domänen in Hefezellen exprimiert. Das an die DNA-Bindedomäne fusionierte Protein wird dabei als *bait*, das an die Aktivierungsdomäne fusionierte Protein als *prey* bezeichnet. Kommt es im Zellkern zur Interaktion zwischen *bait* und *prey*, gelangen die beiden Gal4-Domänen in große räumliche Nähe zueinander und können somit ihre Funktionalität rekonstituieren. Dadurch kommt es zur Expression von Reportergenen (z.B. *HIS3* und *MEL1*), die mit dem Gal4-Promotor assoziiert vorliegen.



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

Die auf Interaktion zu untersuchenden Proteine werden als *bait*- bzw. *prey*-Fusionsproteine in Hefezellen exprimiert. Findet eine Interaktion statt, gelangen die beiden Domänen des Gal4-Transkriptionsfaktors (DNA-Bindedomäne (DBD) und Aktivierungsdomäne (AD)) in räumliche Nähe zueinander. Dadurch wird die Funktion des Transkriptionsfaktors rekonstituiert, was die Expression eines oder mehrerer Reportergene initiiert.

Das Y2H-System wird im kleinen Maßstab auf Agarplatten mit entsprechendem Selektionsmedium durchgeführt. Die jeweiligen *bait*- und *prey*-Plasmide (pGBKT7 und pGADT7) wurden zunächst einzeln in Hefestämme (Leucin-/Tryptophan-auxotroph) von gegensätzlichem *Mating*-Typus transformiert und mit Hilfe von Auxotrophiemarkern selektioniert (pGBKT7: *TRP1*-Gen; pGADT7: *LEU2*-Gen). Zum *Mating* wurden die transformierten Hefezellen auf YPD-Agar vermischt und 5 h bei Raumtemperatur

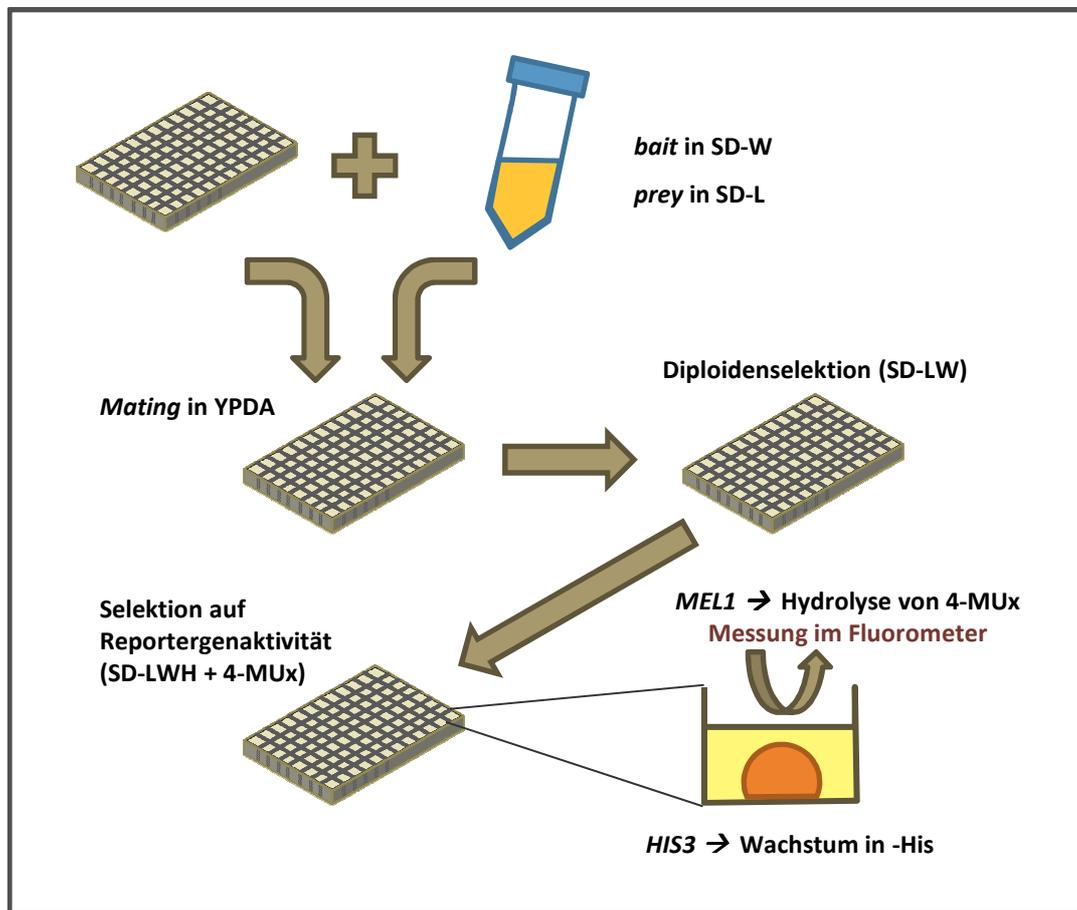
inkubiert. Danach wurden sie auf Doppelselektivplatten übertragen (SD-LW), damit nur diploide Zellen, die beide Plasmide enthalten, wachsen können (3d, 30°C). Zur Überprüfung der Reporterogenaktivität (*HIS3*) wurden diese anschließend auf Dreifach-Selektivplatten (SD-LWH) ausgestrichen (3d, 30°C). Um eine unspezifische Hintergrundaktivität des *HIS3*-Reportergens zu unterdrücken, wurden dem Medium verschiedene Konzentrationen 3-Aminotriazol (3-AT) zugefügt, welches das durch *HIS3* kodierte Enzym inhibiert.

#### 3.3.7.1.1 Das Hefe-2-Hybridssystem im Hochdurchsatz: Matrix-basierte Y2H-Screens

Um das Hefe-2-Hybridssystem im großen Maßstab anzuwenden, wurde das sogenannte Y2H *Direct Mating* angewendet (siehe Abbildung 3.4). Dieses System erlaubt es, einzelne Proteine im Hochdurchsatz gegen eine große Zahl von definierten möglichen Interaktionspartnern zu testen. Die Durchführung erfolgt dabei in 96-well Mikrotiterplatten in Flüssigmedien. Diese Form der Y2H-Anwendung wird als Matrix- oder *array*-basiert bezeichnet, da im Gegensatz zu *Library*-basierten Y2H-Screens die Identität der zu testenden Proteine und damit ihre Position innerhalb der Matrix bekannt ist. Somit wird jedes potenzielle Interaktionspaar einzeln geprüft.

Die mit den *prey*-Plasmiden transformierten Hefen werden in 96-well Mikrotiterplatten unter Selektionsbedingungen (SD-L) herangezogen, die Kultivierung der *bait*-Plasmid-tragenden Hefen erfolgte ebenfalls im Selektionsmedium (SD-W) unter Schütteln im 50-ml-Falconröhrchen (30°C, über Nacht). Zum *Mating* wurden 25 µl jeder Kultur in 100 µl YPDA-Medium (YPD-Medium, 20 mg/l L-Adenin) in 96-well Mikrotiterplatten mit U-Form vereinigt, leicht zentrifugiert (1 min, 180 x g) und über Nacht bei 30°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 15 µl des *Mating*-Ansatzes auf 96-well Mikrotiterplatten mit 200 µl Doppelselektivmedium (SD-LW) übertragen und erneut inkubiert (2d, 30°C). Anschließend wurden 15 µl der diploiden Hefen auf 96-well Mikrotiterplatten (F-Form) mit Dreifach-Selektionsmedium (SD-LWH) transferiert, das 50 µM 4-Methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-galactopyranosid (4-MUX) und verschiedene 3-AT-Konzentrationen enthielt. Nach dreitägiger Inkubation (30°C) wurde die Reporterogenaktivität im Multi-Plattenlesegerät gemessen. Die Rekonstitution des Gal4-Transkriptionsfaktors durch eine stattfindende *bait-prey*-Interaktion initiiert die Expression der Reportergene *HIS3* und *MEL1*. His3 ist für das Wachstum der Hefen in Histidin-freiem Medium verantwortlich, die  $\alpha$ -Galactosidase Mel1 katalysiert die Hydrolyse von 4-MUX, das fluorogene Produkt kann im Fluorometer gemessen werden (Anregung 365 nm, Emission 448 nm). Über die Fluoreszenzintensität (RFU, *relative fluorescence units*) können die *bait-prey*-Paare als interagierend bzw. nicht-interagierend definiert werden. Selbstverständlich lässt sich das System auch in umgekehrter Orientierung (ein *prey*-Fusionsprotein gegen viele *bait*-Proteine) anwenden.

Alle verwendeten Hefemedien wurden zur Vermeidung von Bakterienkontamination mit 0,5% Penicillin/Streptomycin-Lösung (Invitrogen) versetzt.



**Abbildung 3.4: Hefe-2-Hybridsystem im Hochdurchsatz (Y2H Direct Mating)**

Das Hefe-2-Hybridsystem wird in 96-well Mikrotiterplatten und in Flüssigmedium angewendet. Ein *bait*-Fusionsprotein wird dabei gegen viele *prey*-Proteine getestet oder umgekehrt. Das *Mating* der Plasmidtragenden Hefen findet in 96-well Mikrotiterplatten mit U-Form in YPDA über Nacht statt. Zur Diploidenselektion werden die Hefen in Doppelselektivmedium transferiert (2 d) und anschließend zur Überprüfung der Reporterogenaktivität in Dreifach-Selektivmedium mit 4-Methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-galactopyranosid (4-MUx) übertragen. Findet eine *bait-prey*-Interaktion statt, erlaubt das Reporterogen *HIS3* das Hefewachstum in Histidin-freiem Medium, die durch *MEL1* kodierte  $\alpha$ -Galactosidase hydrolysiert 4-MUx zu einem fluorogenen Produkt, dessen Intensität im Fluorometer gemessen werden kann.

### 3.3.7.2 BRET-Assay (*bioluminescence resonance energy transfer*)

Das BRET-System (*bioluminescence resonance energy transfer*) dient dem Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen (PPI) *in situ* in lebenden Säugerzellen. Es beruht auf der Energieübertragung eines Donors (Renilla Luciferase, Rluc) auf einen Akzeptor (*yellow fluorescent protein*, YFP), wenn diese sich in enger räumlicher Nähe zueinander befinden (Boute *et al.*, 2002; Bacart *et al.*, 2008;

Ciruela, 2008). Die Durchführung des BRET-Assays zur Validierung der Y2H-Daten erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Ania Muntau (LMU München; Gersting *et al.*, 2011).

Die zu testenden Interaktionspartner wurden als Fusionsproteine in HEK293-Zellen im 96-*well*-Format koexprimiert. Die Transfektion der DNA erfolgte in Duplikaten mittels Nucleofektion im Akzeptor/Donor Verhältnis von 3 zu 1 (Lonza; siehe 3.3.3.2). Anschließend wurden die transfizierten Zellen 48 h in DMEM (ohne Phenolrot, 10% FCS, 1% Pen/Strep-Lösung) in weißen 96-*well* Mikrotiterplatten mit durchsichtigem Boden inkubiert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Die BRET-Messung erfolgte 2 min nach Zugabe des Luciferase-Substrats Coelenterazin (30 µM in PBS) über einen Zeitraum von 10 s im Multi-Plattenlesegerät. Die Lichtemission der Luciferase wird bei 485 nm gemessen und die des Fluorophors (YFP) bei 535 nm. Die BRET-Ratio R berechnet sich nun aus dem Verhältnis von YFP-Signal und Luciferase-Signal sowie einem internen Korrekturfaktor cf ( $R = (I_{535 \text{ nm}}/I_{485 \text{ nm}})\text{-cf}$ ). Der Korrekturfaktor wird parallel bei jedem Durchgang bestimmt und dient dazu, das „Durchbluten“ des Luciferase-Signals im YFP-Kanal zu detektieren. Dazu wurde ein Luciferase-Fusionsprotein als Kontrolle exprimiert (Rluc-Kontrolle) und die Emissionen gemessen.

### 3.3.8 Mikroskopische Methoden

#### 3.3.8.1 Indirekte Immunfluoreszenz (IF)

HeLa- oder Verozellen wurden in gewünschter Dichte (in der Regel 1 - 1,5x 10<sup>5</sup> Zellen pro 12-*well*) auf Deckgläschen ausgesät und je nach Fragestellung behandelt (unbehandelt, DNA-Transfektion, HSV-1 Infektion). Zur immunhistochemischen Färbung wurden die Zellen zunächst mit 2% Formaldehyd/PBS fixiert, nach dreimaligem Waschen (PBS) mit 0,5% Triton X-100/PBS bei 4°C permeabilisiert und erneut gewaschen. Bei HSV-1 infizierten Zellen folgte ein Inkubationsschritt mit humanem Immunglobulin G (hIgG, 0,2 mg/ml in PBS), um die membranständigen herpesviralen Glykoprotein-dimere gE/gI, die als Rezeptor für den konstanten Teil von Antikörpern (Fc) fungieren, zu sättigen (4°C über Nacht oder 3 h bei Raumtemperatur). Anschließend wurden die Zellen mit spezifischen Primärantikörpern inkubiert (10-15 min in PBS) und diese nach wiederholtem Waschen analog mit Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörpern markiert. Zur Visualisierung der Zellkerne wurde die zelluläre DNA mit dem Fluorochrom DAPI gefärbt (0,5 µg/ml, 5 min in PBS). Abschließend wurden die Deckgläschen mit den Zellen dreimal mit PBS und zur Entfernung der Salze einmal mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gewaschen und mit 5 µl Mounting Medium (Dianova) mit der bewachsenen Seite nach unten auf Objektträger montiert. Die Mikroskopie wurde entweder am Fluoreszenzmikroskop (Leica AF6000) oder am Konfokalmikroskop (Leica TCS SP5) durchgeführt und die Ergebnisse mit der zugehörigen Kamera und Software dokumentiert. Die Prozessierung der Bilder erfolgte durch Adobe Photoshop.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Erweiterung des intraviralen Proteininteraktionsnetzwerkes von HSV-1

#### 4.1.1 Identifizierung neuer intraviraler Proteininteraktionen mittels Matrix-basiertem Hefe-2-Hybridsystem

Das Netzwerk der intraviralen Protein-Protein-Interaktionen (PPI) des Herpes simplex-Virus 1 wurde vor einiger Zeit mittels Hefe-2-Hybridsystem (Y2H) erstellt (Schmidt, 2009). Über den Vergleich mit den Interaktionsnetzwerken vier anderer Herpesvirus-Spezies konnte so ein evolutionär konserviertes herpesvirales Interaktionsnetzwerk präsentiert werden (Fossum *et al.*, 2009). Dabei wurden die viralen Membranproteine zumeist als Volle-Länge-Proteine eingesetzt, in einzelnen Fällen wurden auch Transmembrandomänen-freie (TM) Proteinfragmente benutzt. Insgesamt war die Ausbeute an neu identifizierten oder bereits bestätigten Interaktionsdaten von Membranproteinen jedoch besonders im Kontext des reifen Viruspartikels relativ gering. Selbst sehr gut charakterisierte Wechselwirkungen der am *Virus-entry* beteiligten Membranproteine wurden nicht gefunden. Dies könnte durch das Y2H-System selbst hervorgerufen worden sein, da die hydrophoben Domänen von Membranproteinen das im Hefenukklus lokalisierte Y2H-Reportersystem stören können.

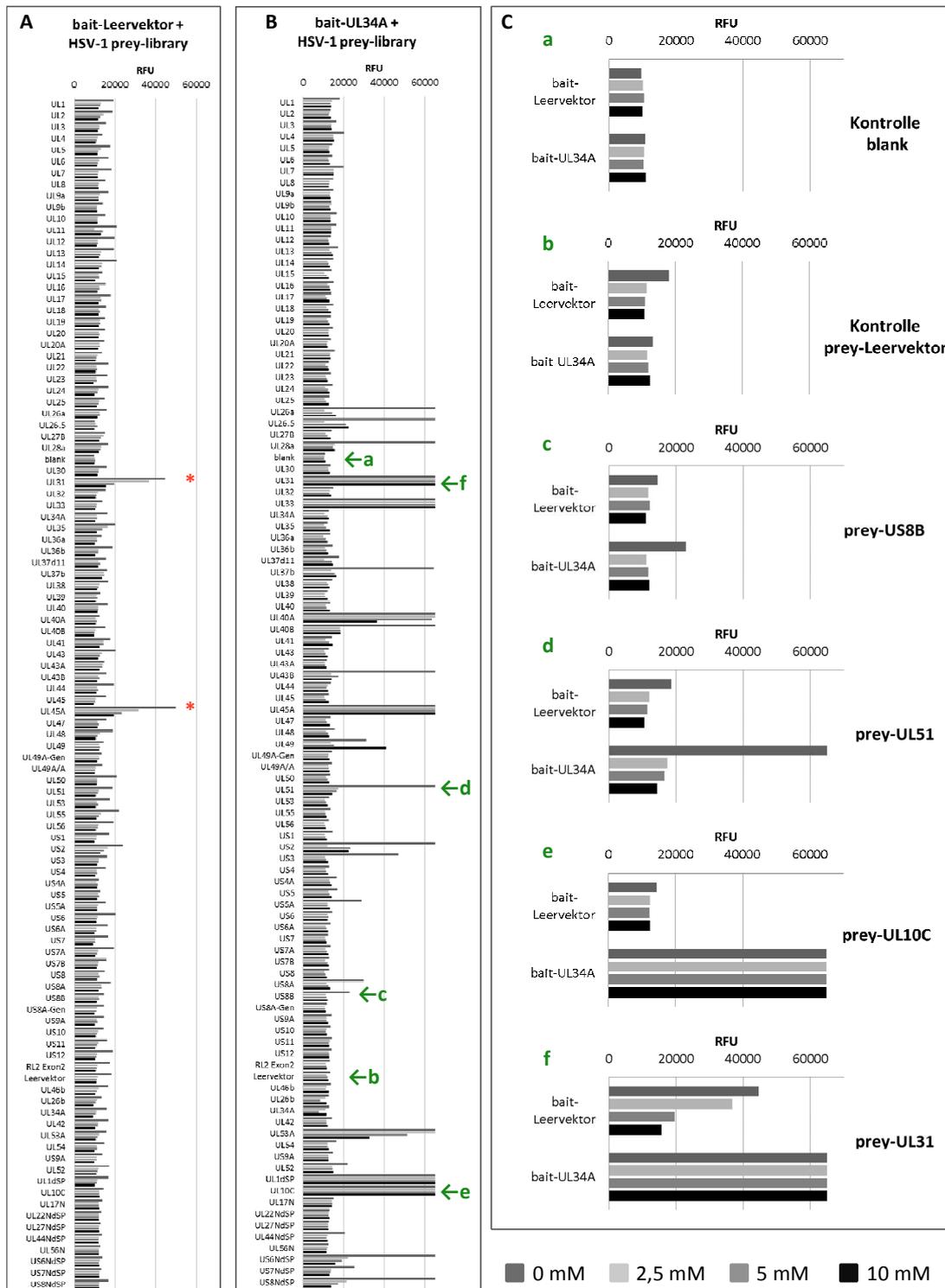
Besonders die Schritte der viralen Morphogenese, an denen HSV-1 Membranproteine beteiligt sind, wie z.B. die der primären und sekundären Umhüllung, sind nur zum Teil aufgeklärt. Um neue Interaktionsmuster und damit zusätzliche Erkenntnisse über die Mechanismen während der HSV-1 Replikation zu erlangen und gleichzeitig die Problematik der Volle-Länge-Proteine im Y2H-System zu beheben, wurde die HSV-1 Kollektion (siehe 3.1.7.2) systematisch um kodierende Fragmente der viralen Membranproteine ohne hydrophobe TM-Domänen oder Signalpeptidsequenzen erweitert. Die Information über die Topologie der Membranproteine wurde aus der einschlägigen Literatur bezogen und die Position der TM-Domänen bzw. Signalpeptidsequenzen innerhalb der Proteinsequenz mit Hilfe von Algorithmen berechnet (CBS Prediction Servers: TMHMM Server v. 2.0 und SignalP 3.0 Server). Die Verwendung der Gateway-Klonierung (siehe 3.3.5.6) erlaubte dabei das einfache Umsetzen der Inserts in die Y2H *bait*- und *prey*-Hefevektoren. Für das Matrix-basierte Y2H-System in Flüssigmedien (siehe 3.3.7.1.1) wurden 18 extramembranäre Proteinfragmente (siehe Tabelle 4.1) von insgesamt 15 HSV-1 Membranproteinen jeweils als *bait*- oder *prey*-Fusionsprotein gegen die gesamte HSV-1 Kollektion getestet.

Tabelle 4.1: HSV-1 Membranproteinfragmente

Fragment	Proteintyp	kodiert	Lokalisierung
UL1dSP	peripher assoziiert	gL ohne Signalpeptid	luminal/extrazellulär
UL10C	Typ-III	C-terminale Domäne von gM	cytoplasmatisch
UL20A	Typ-III	N-terminale Domäne von pUL20	cytoplasmatisch
UL22NdSP	Typ-I	N-terminale Domäne von gH ohne Signalpeptid	luminal/extrazellulär
UL27NdSP	Typ-I	N-terminale Domäne von gB ohne Signalpeptid	luminal/extrazellulär
UL27B	Typ-I	C-terminale Domäne von gB	cytoplasmatisch
UL34A	<i>tail-anchor</i>	N-terminale Domäne von pUL34	cytoplasmatisch
UL44NdSP	Typ-I	N-terminale Domäne von gC ohne Signalpeptid	luminal/extrazellulär
UL45A	Typ-II	C-terminale Domäne von pUL45	luminal/extrazellulär
UL53A	Typ-III	N-terminale Domäne von gK ohne Signalpeptid	luminal/extrazellulär
US4A	Typ-I	N-terminale Domäne von gG ohne Signalpeptid	luminal/extrazellulär
US5A	Typ-I	N-terminale Domäne von gJ ohne Signalpeptid	luminal/extrazellulär
US6NdSP	Typ-I	N-terminale Domäne von gD ohne Signalpeptid	luminal/extrazellulär
US7NdSP	Typ-I	N-terminale Domäne von gI ohne Signalpeptid	luminal/extrazellulär
US7B	Typ-I	C-terminale Domäne von gI	cytoplasmatisch
US8NdSP	Typ-I	N-terminale Domäne von gE ohne Signalpeptid	luminal/extrazellulär
US8B	Typ-I	C-terminale Domäne von gE	cytoplasmatisch
US9A	Typ-II; evtl. <i>tail anchor</i>	N-terminale Domäne von pUS9	cytoplasmatisch

Die Auswertung der Matrix-basierten Y2H-Screens soll hier exemplarisch am Beispiel von *bait*-UL34A erläutert werden. Nach *Mating* und Selektion der diploiden Hefen wurden diese zur Wachstumskontrolle in Doppelsektivmedium (SD-LW) und zur Überprüfung der Reporterogenaktivität in Dreifachsektivmedium (SD-LWH) mit 4-MUx transferiert. Zur Unterdrückung der unspezifischen Hintergrundaktivität des *HIS3*-Reportergens wurde dabei Medium mit vier Konzentrationen des Inhibitors 3-AT verwendet (0 mM, 2,5 mM, 5 mM und 10 mM). Nach drei Tagen Inkubation erfolgte die Messung der relativen Fluoreszenzintensität (RFU, *relative fluorescence units*). Die Interaktion eines *bait-prey* Paares induziert die Expression der  $\alpha$ -Galactosidase Mel1, die als Reportersystem die Hydrolyse von 4-MUx katalysiert, sodass ein fluorogenes Produkt entsteht. Parallel zu jedem *Screen* wurde die HSV-1 Kollektion gegen den entsprechenden Leervektor getestet, um die Autoaktivierung einzelner Proteine zu erkennen und somit falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden. Die Fluoreszenzintensität eines Proteinpaares wurde demnach immer mit der Fluoreszenzintensität des Partners aus der HSV-1 Kollektion in Kombination mit dem Leervektor verglichen. Als zusätzliche interne Kontrolle war eine Position der HSV-1

Kollektion mit dem entsprechenden Leervektor besetzt, außerdem erfolgte die Messung einer Hefe-freien Probe (*blank*).



**Abbildung 4.1: Auswertungsbeispiel des Matrix-basierten Y2H-Screens**

(A) Zur Kontrolle auf Autoaktivierung wurde parallel zu jedem Screen die HSV-1 Kollektion (hier als *prey-library*) gegen den entsprechenden Leervektor getestet. Leicht autoaktivierende Fusionsproteine sind mit einem Sternchen gekennzeichnet. (B) Die Auswertung der Fluoreszenzintensitäten eines Screens (hier z.B. *bait-UL34A*)

erfolgte jeweils im Vergleich zum Leervektor. (C) Beispielhaft sind hier einige typische Werte jeweils im Vergleich zum Leervektor hervorgehoben. Zwei interne Kontrollen zeigen (a) das Hintergrundrauschen der verwendeten Flüssigmedien ohne Hefewachstum (*blank*) und testen unter Verwendung des Leervektors als Partner auf Autoaktivierung (b). Eine schwache Signalerhöhung ohne 3-AT, die nach Zugabe von 3-AT wieder abnimmt, wird als negativ gewertet (c), während ein starkes Signal bei 0 mM 3-AT als schwache Interaktion definiert wird (d). Eine starke Interaktion lässt sich durch steigende 3-AT-Konzentrationen nur wenig oder gar nicht inhibieren (e). Obwohl ein Interaktionspartner autoaktivierende Eigenschaften besitzt, kann das Paar als positiv bewertet werden, wenn die Signalstärke im Vergleich zum Leervektor deutlich ansteigt (f).

In Abbildung 4.1 sind die Fluoreszenzwerte des *bait*-Leervektors (A) und des *bait*-UL34A (B) gegen die HSV-1 *prey*-library als Balkendiagramme dargestellt. Es ist eindeutig zu erkennen, dass *prey*-UL31 sowie -UL45A bei niedrigen Konzentrationen von 3-AT die Fähigkeit zur Autoaktivierung des Reportersystems besitzen (siehe Abbildung 4.1 A, Sternchen). Dies muss bei der Auswertung der parallel getesteten *bait*s berücksichtigt werden. Einzelne Werte der Diagramme des *bait*-Leervektors und *bait*-UL34A (grüne Kleinbuchstaben) sind in Abbildung 4.1 C zur Demonstration der Auswertung vergrößert gegenübergestellt. Die Fluoreszenzintensität der *blank*-Probe (a) entspricht dem Hintergrundrauschen des Hefemediums und ist erwartungsgemäß auf allen Platten gleich. In (b) ist zu erkennen, dass *bait*-UL34A nicht autoaktivierend wirkt, was mit dem Gesamteindruck der Fluoreszenzwerte übereinstimmt. Ein autoaktivierendes *bait*-Fusionsprotein würde insgesamt sehr viel höhere Fluoreszenzwerte mit allen *prey*-Partnern erzeugen als in Abbildung 4.1 B zu sehen ist. Als Beispiel für ein *prey*-Protein, das ohne 3-AT zwar mit *bait*-UL34A ein gegenüber dem *bait*-Leervektor leicht erhöhtes Signal produziert, jedoch auf Grund der Signalschwäche nicht als positiv gewertet wird, ist *prey*-US8B (c). Für die Definition als positives Interaktionspaar muss die Fluoreszenzintensität mindestens bei 0 mM 3-AT stark ausgeprägt sein. Als schwach positive Interaktion werden solche Werte wie z.B. von *prey*-UL51 gewertet (d), bei denen die Signalstärke bei 0 mM 3-AT sehr hoch ist, allerdings bei zunehmender 3-AT Konzentration abnimmt. Bei einer stark positiven Interaktion wie mit *prey*-UL10C (e) bleibt die Fluoreszenzintensität allerdings auch bei höheren 3-AT Konzentrationen ähnlich stark erhalten. Ein repräsentatives Beispiel für die Positivwertung einer Interaktion, bei der ein Partner allein zwar leicht autoaktivierend wirkt, allerdings das Paar gemeinsam wesentlich stärkere Signale induziert, ist die vielfach publizierte Interaktion von *bait*-UL34A mit *prey*-UL31 (f). Alle Signale, die vergleichbar mit der *blank*-Probe oder der Verwendung des Leervektors als Partner waren, wurden als negativ bewertet.

Nach diesem System wurden alle 36 durchgeführten Y2H-Screens ausgewertet. Interaktionspaare von Proteinfragmenten, die auf Grund gegensätzlicher Lokalisierung entlang der Membranen nicht miteinander wechselwirken können, wurden als falsch-positiv aussortiert. Das Ergebnis dieser Y2H-Analyse ist in Tabelle 4.2 dargestellt. Der sogenannte *prey*- und *bait*-count gibt an, wie oft das entsprechende Fusionsprotein als positiver Interaktionspartner insgesamt im Rahmen des Screens

gefunden wurde. Hier würde ein sehr hoher Wert (maximal 18) auf ein autoaktivierendes Protein hinweisen. Über die Paarung mit dem Leervektor wurden allerdings autoaktivierende Proteine von der Wertung bereits ausgeschlossen (z.B. *bait*-UL26.5). Einige *prey*-Fusionsproteine (wie –UL1dSP oder –UL45A) zeigen einen höheren Wert, und eine leichte Autoaktivierung ließ sich auch im *Screen* gegen die HSV-1 *bait-library* feststellen. Da allerdings immer sorgfältig im Vergleich zum Leervektor ausgewertet wurde, werden die Interaktionen als vertrauenswürdig beurteilt.

Zur besseren Übersicht sind alle Membranproteine in Tabelle 4.2 in roter Schrift dargestellt und - falls vorhanden - mit ihrem Glykoproteinnamen in Klammern versehen. Interaktionspaare, die entweder bidirektional oder mit mehr als einem Fragment desselben Proteins gefunden wurden, sind farbig hinterlegt. Die partielle Überlappung mit dem vorangegangenen intraviralen Y2H-*Screen* (Schmidt, 2009) ist durch Unterstriche markiert und umfasst insgesamt 5 Interaktionspaare. Mit sechs der 18 getesteten Membranproteinfragmenten konnten keine Daten generiert werden (UL27B, US4A, US5A, US6NdSP, US7NdSP und US8B) und fünf weitere Fusionsproteine erbrachten nur in eine Richtung positive Resultate (UL22NdSP, UL27NdSP, UL44NdSP, US8NdSP sowie US9A).

**Tabelle 4.2: Mittels Y2H-Analyse detektierte Proteininteraktionen der HSV-1 Membranproteinfragmente**

bait	prey	prey-count	prey	bait	bait-count
UL1dSP (gL)	UL1dSP (gL)	8	UL1dSP (gL)	UL53A (gK)	3
UL1dSP (gL)	UL53A (gK)	7	UL1dSP (gL)	UL45A	2
UL1dSP (gL)	US6NdSP (gD)	5	UL1dSP (gL)	UL1 (gL)	1
UL10C (gM)	UL33	8	UL1dSP (gL)	US8A (gE)	1
UL10C (gM)	UL10C (gM)	3	UL1dSP (gL)	UL1dSP (gL)	2
UL10C (gM)	UL31	2	UL1dSP (gL)	UL22NdSP (gH)	1
UL10C (gM)	UL40A	6	UL1dSP (gL)	US6NdSP (gD)	1
UL10C (gM)	US2	7	UL1dSP (gL)	US8NdSP (gE)	3
UL10C (gM)	UL28a	2	UL1dSP (gL)	UL56	4
UL10C (gM)	UL40B	2	UL1dSP (gL)	US8 (gE)	1
UL10C (gM)	UL49	2	UL1dSP (gL)	US8A-Gen	1
UL10C (gM)	UL52	1	UL10C (gM)	UL34A	5
UL10C (gM)	UL56N	2	UL10C (gM)	UL38	3
UL20A	keine Interaktion	-	UL10C (gM)	UL10C (gM)	4
UL22NdSP (gH)	keine Interaktion	-	UL10C (gM)	UL56N	7
UL27NdSP (gB)	keine Interaktion	-	UL10C (gM)	UL7	6
UL27B (gB)	keine Interaktion	-	UL10C (gM)	UL14	6
<u>UL34A</u>	<u>UL31</u>	2	UL10C (gM)	UL31	4
UL34A	UL33	8	UL10C (gM)	UL56	4
UL34A	UL40A	6	UL10C (gM)	US10	3
UL34A	UL10C (gM)	3	UL10C (gM)	UL54	3

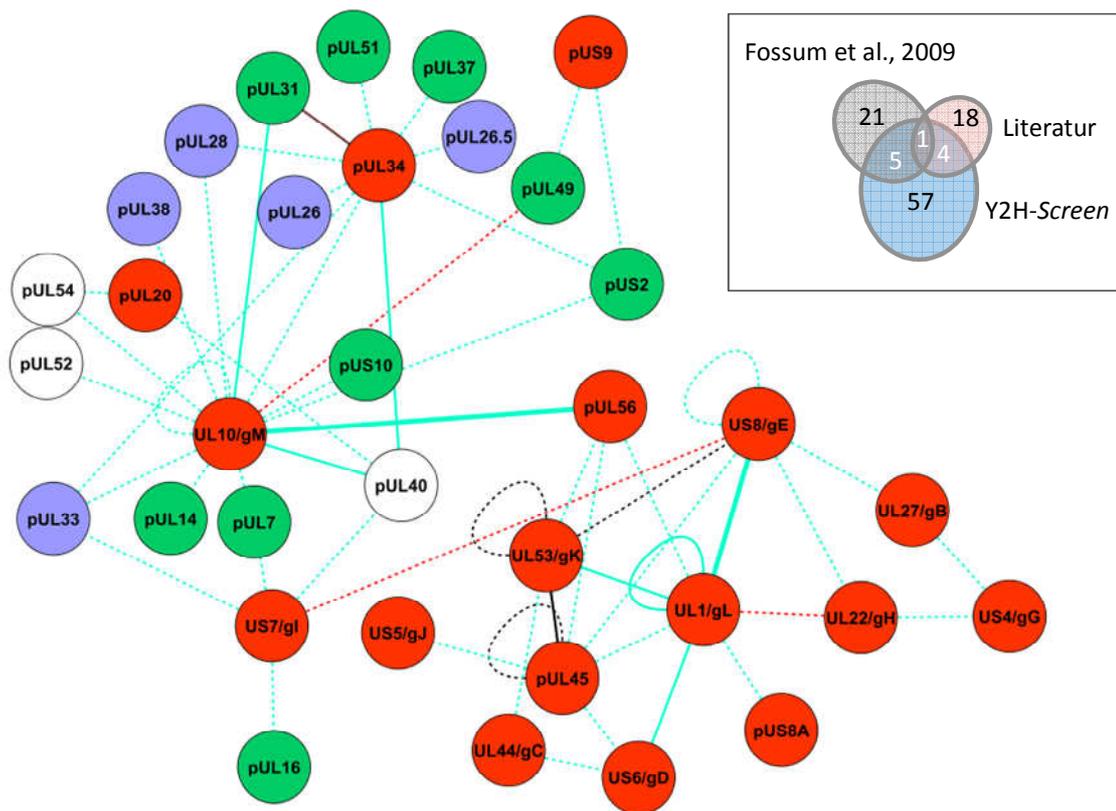
bait	prey	prey-count
UL34A	US2	7
UL34A	UL26a	1
UL34A	UL26.5	1
UL34A	UL28a	2
UL34A	UL37b	2
UL34A	UL40B	2
UL34A	UL51	1
UL44NdSP (gC)	US6NdSP (gD)	5
UL44NdSP (gC)	UL53A (gK)	7
UL45A	UL1dSP (gL)	8
<u>UL45A</u>	<u>UL53A (gK)</u>	7
UL45A	US6NdSP (gD)	5
UL53A (gK)	UL1dSP (gL)	8
<u>UL53A (gK)</u>	<u>UL53A (gK)</u>	7
US4A (gG)	keine Interaktion	-
US5A (gJ)	keine Interaktion	-
US6NdSP (gD)	keine Interaktion	-
US7NdSP (gI)	keine Interaktion	-
US7B (gI)	UL33	8
US7B (gI)	UL40A	6
US8NdSP (gE)	UL22NdSP (gH)	1
US8NdSP (gE)	UL27NdSP (gB)	1
US8NdSP (gE)	US7NdSP (gI)	1
US8NdSP (gE)	US8NdSP (gE)	8
<u>US8NdSP (gE)</u>	<u>UL53A (gK)</u>	7
US8NdSP (gE)	UL1dSP (gL)	8
US8B (gE)	autoaktivierend	-
US9A	US2	7
US9A	UL49	2

prey	bait	bait-count
UL20A	UL40	1
UL20A	UL54	3
UL22NdSP (gH)	US4A (gG)	2
UL27NdSP (gB)	US4A (gG)	2
UL27B (gB)	keine Interaktion	-
<u>UL34A</u>	<u>UL31</u>	4
UL44NdSP (gC)	keine Interaktion	-
UL45A	UL56	4
<u>UL45A</u>	<u>UL53A (gK)</u>	3
UL45A	US5A (gJ)	1
UL45A	US8NdSP (gE)	3
<u>UL45A</u>	<u>UL45A</u>	2
<u>UL53A (gK)</u>	<u>UL53A (gK)</u>	3
UL53A (gK)	UL1dSP (gL)	2
<u>UL53A (gK)</u>	<u>US8NdSP (gE)</u>	3
UL53A (gK)	UL56	4
US4A (gG)	keine Interaktion	-
US5A (gJ)	keine Interaktion	-
US6NdSP (gD)	keine Interaktion	-
US7NdSP (gI)	keine Interaktion	-
US7B (gI)	UL7	6
US7B (gI)	UL16	4
US8NdSP (gE)	keine Interaktion	-
US8B (gE)	keine Interaktion	-
US9A	keine Interaktion	-

#### 4.1.2 Das Interaktionsnetzwerk der HSV-1 Membranproteine

Die mittels Y2H-Analyse ermittelten Interaktionen der Membranproteinfragmente mit Volle-Länge-Proteinen (VL) oder Proteinfragmenten der HSV-1 Kollektion lassen sich nun so zusammenfassen, dass ein intravirales Interaktionsnetzwerk der HSV-1 Membranproteine entsteht (siehe Abbildung 4.2 und Anhang 7.2.1). Dieses Netzwerk wurde mit Hilfe der *Cytoscape-Software* erstellt (Shannon *et al.*, 2003) und erlaubt die Visualisierung großer Datenmengen zu einem übersichtlichen Diagramm. Auf diese Art und Weise fällt es leichter, Strukturen wie z.B. einzelne Module oder hochverknüpfte *hubs* zu identifizieren. Außerdem lässt sich so die Topologie eines Netzwerkes bestimmen.

Zunächst wurde auf die Differenzierung der Interaktionsrichtung (*bait* und *prey*) verzichtet und die Proteinfragmente jeweils ihrem entsprechenden VL-Protein zugeordnet (z.B. US7NdSP und US7B → US7). Da es sich um die Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen (PPI) handelt, wurden alle verwendeten ORFs mit ihrem jeweiligen Proteinnamen versehen, entweder durch Voranstellung eines „p“ (z.B. pUL33) oder die Verwendung der jeweiligen Glykoproteinbezeichnung der Membranproteine (z.B. UL10/gM). Zur besseren Übersicht sind Membranproteine als rote Knoten dargestellt, Tegumentproteine grün und Capsidproteine blau. Weiß sind solche Proteine, die sich keiner dieser Strukturen zuordnen lassen. Die gestrichelten Verbindungslinien repräsentieren unidirektionale Interaktionen. Interaktionspaare, die bidirektional oder mit mehreren Fragmenten eines Partners gefunden wurden, sind mit einer einfachen (zweimal) oder fetten (dreimal) *edge* verbunden. Das Netzwerk besteht aus 34 Knoten und 57 Verbindungslinien, davon sind fünf Selbstinteraktionen. Neue PPI werden durch blaue Linien dargestellt, die schwarzen *edges* markieren solche Y2H-Interaktionen, die bereits im vorangegangenen *Screen* identifiziert wurden (Fossum *et al.*, 2009; Schmidt, 2009) und anderweitig publizierte Interaktionen sind durch rote Verbindungslinien gekennzeichnet (Johnson *et al.*, 1988; Roop *et al.*, 1993; Reynolds *et al.*, 2001; Chi *et al.*, 2005; Perez-Romero *et al.*, 2005; Atanasiu *et al.*, 2007; Avitabile *et al.*, 2007; Farnsworth *et al.*, 2007; Foster *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2008; Stylianou *et al.*, 2009; Wills *et al.*, 2009; Chouljenko *et al.*, 2010). Demnach konnten also insgesamt 48 neue Interaktionspaare identifiziert werden. Die Topologie gleicht anderen herpesviralen Interaktionsnetzwerken (Uetz *et al.*, 2006; Fossum *et al.*, 2009). Es gibt einige hochverknüpfte *hubs* (wie z.B. gM mit 16 Interaktionspartnern), der durchschnittliche Verknüpfungsgrad beträgt einen Wert von 3,2. Es gibt allerdings nur wenige periphere Knoten, die einen Verknüpfungsgrad von 1 besitzen. Aus dieser Gradverteilung ergibt sich eine Regressionsgerade mit einem relativ niedrigen Potenzkoeffizienten  $\gamma$  (1,039), wenn die Verknüpfungsgrade logarithmisch aufgetragen werden. Dieser Wert ist vergleichbar mit bereits publizierten herpesviralen Interaktionsnetzwerken, bei denen die Gerade flacher verläuft als bei typischen zellulären Interaktomen (Uetz *et al.*, 2006). Daher ist auch dieses Netzwerk nicht als skalenfrei zu bezeichnen. Die durchschnittliche Pfadlänge, also die Verknüpfung zweier beliebiger Knoten miteinander, beträgt 3,3. Dieses Netzwerk ist nicht in Submodule unterteilt, sondern stellt ein einziges Modul dar. Der Eindruck der Modularität ergibt sich daraus, dass im Y2H-*Screen* luminale und cytoplasmatische Fragmente der Membranproteine verwendet wurden und sich das Netzwerk somit in cytoplasmatisch (links) und exoplasmatisch (rechts) lokalisierte Interaktionen unterteilt. Diese beiden „Module“ werden nur durch zwei *edges* miteinander verbunden, was der Tatsache geschuldet ist, dass bloß von wenigen Membranproteinen gleichzeitig mit cytoplasmatischen und luminalen Fragmenten Daten generiert werden konnten.



**Abbildung 4.2: Intravirales Interaktionsnetzwerk der HSV-1 Membranproteine**

Die mittels Y2H identifizierte Proteininteraktionspaare der Membranproteine von HSV-1 sind in diesem Netzwerk zusammengefasst. Einzelne Proteine sind als Knoten dargestellt (rot = Membran, grün = Tegument, blau = Capsid, weiß = andere), ihre Interaktion ist als Verbindungslinie abgebildet. Gestrichelte Linien bedeuten eine unidirektionale Interaktion, solide Linien stehen entweder für bidirektionale Interaktionen oder solche, bei denen mehrere Fragmente eines Partners als interagierend gefunden wurden (einfache Linie = zweimal; dicke Linie = dreimal). Blaue *edges* stellen neue Interaktionspaare dar, schwarze Linien bedeuten Überlappung mit dem vorangegangenen Y2H-Screen (Fossum *et al.*, 2009) und rote Verbindungslinien sind anderweitig bereits publizierte PPI (Johnson *et al.*, 1988; Roop *et al.*, 1993; Reynolds *et al.*, 2001; Stylianou *et al.*, 2009). Die Schnittmengen der Interaktionen der HSV-1 Membranproteine aus Literatur, Fossum *et al.*, 2009 und dem hier beschriebenen Y2H-Screen sind im Kästchen grafisch dargestellt.

Die gemeinsame Schnittmenge der Interaktionen von HSV-1 Membranproteinen aus der Literatur, Fossum *et al.*, 2009 und diesem Y2H-Screen ist in Abbildung 4.2 grafisch dargestellt (Kästchen). Obwohl die HSV-1 Membranproteine an vielen Schritten des Replikationszyklus beteiligt sind und somit viele Interaktionen vermutet werden, sind nur 18 Interaktionen bekannt, bei denen mindestens ein Partner Membranprotein ist. Davon konnten 4 Paare, also knapp ein Fünftel der geläufigen Interaktionen, in diesem Y2H-Screen wiedergefunden werden. Andererseits fehlen einige sehr gut charakterisierte Interaktionen, wie zum Beispiel zwischen den am *Virus-entry* beteiligten gH und gB (Atanasiu *et al.*, 2007; Avitabile *et al.*, 2007) oder gK und pUL20 (Foster *et al.*, 2008). Dies zeigt die Grenzen dieses Y2H-Screens auf. Einerseits führt jede Methode zur Identifizierung von PPI zu

einem gewissen Prozentsatz zu falsch-negativen Daten. Andererseits konnten in diesem Y2H-Screen unter Verwendung der extramembranären Fragmente nur solche Interaktionen detektiert werden, bei denen die entsprechenden Fragmente beider Partner vorhanden waren, die die Wechselwirkung vermitteln.

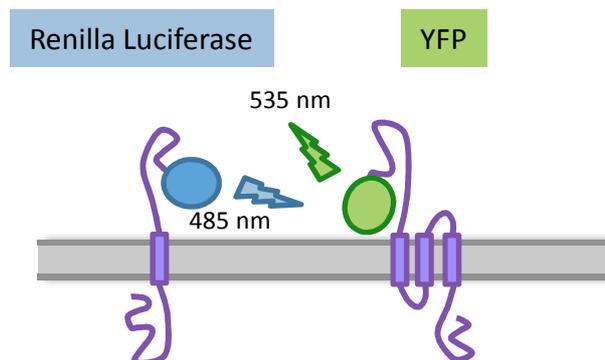
Knapp ein Viertel der PPI des vorangegangenen Y2H-Datensatzes, bei dem mindestens ein Membranprotein als Partner involviert ist, konnten erneut identifiziert werden. Diese nur partielle Überlappung resultiert daraus, dass in beiden Y2H-Screens unterschiedliche *bait*- und *prey*-Fusionsproteine verwendet wurden, nämlich ausschließlich Fragmente der Membranproteine in dieser Studie im Gegensatz zu den Volle-Länge-Proteinen aus Fossum *et al.*, 2009. Allerdings gilt die Reproduzierbarkeit der überlappenden PPI als Validierung ihrer Interaktion. Die einzige gemeinsame PPI, die sowohl in beiden Y2H-Ansätzen vorkam als auch durch unabhängige Publikationen sehr gut charakterisiert ist (Reynolds *et al.*, 2001), ist die des *nuclear egress complex* pUL34 und pUL31.

Besonders auffällig an diesem Netzwerk sind einige hochverknüpfte *hubs*, wie sie beispielsweise von pUL34 und gM gebildet werden. Die neu identifizierten Interaktionspartner von pUL34 sind vor allen Dingen Tegument- und Capsidproteine. Dieser Befund könnte in Einklang mit seiner zentralen Funktion (zusammen mit pUL31) an der Auswanderung der Capside aus dem Zellkern stehen. Die Aufgabe von gM während des HSV-1 Replikationszyklus ist noch nicht abschließend geklärt. Allein die Fülle der hier identifizierten Interaktionspartner weist auf eine wichtige Bedeutung von gM hin, weshalb seine Funktionalität näher untersucht werden sollte (siehe auch 4.2). Weitere Interpretationen, die aus diesem Datensatz abgeleitet werden können, werden in der Diskussion besprochen (siehe 5.2).

#### **4.1.3 Das BRET-System als Validierungsmöglichkeit für Protein-Protein-Interaktionen von Membranproteinen**

Mit dem BRET-System (*bioluminescence resonance energy transfer*) können Protein-Protein-Interaktionen (PPI) *in situ* im physiologischen Kontext der Zelle bestimmt werden. Es beruht auf der Koexpression zweier Kandidatenproteine, die an die Renilla-Luciferase (Rluc) bzw. das Fluorochrom YFP (*yellow fluorescent protein*) fusioniert sind. Gelangen die beiden Fusionsproteine über Wechselwirkungen in räumliche Nähe zueinander (10-100 Å), kann nach Substratgabe eine Energieübertragung von der Luciferase (Donor) auf den Akzeptor (YFP) stattfinden (siehe Abbildung 4.3). Beide Emissionen können im Luminometer gemessen werden und besitzen ein voneinander differenziertes Emissionsspektrum (485 nm bzw. 535 nm). Die Verwendung des BRET-Systems zur Analyse von Interaktionen der Membranproteine bietet den Vorteil, dass binäre Interaktionen im Membrankontext detektiert werden. Dabei werden verschiedene Faktoren berücksichtigt, wie die

Topologie eines Membranproteins, posttranslationale Modifikationen und die subzelluläre Sortierung bzw. Lokalisierung der entsprechenden Kandidatenproteine. So besteht die Möglichkeit, falsch-positive Interaktionen des Y2H-Systems, die zwar nach Koexpression im Hefenukleus stattfinden, allerdings im physiologischen Kontext zwecks fehlender Kolo-kalisierung nicht erfolgen können, zu verwerfen. Auf der anderen Seite besitzt das BRET-System beim Einsatz von Membranproteinen auch einige Einschränkungen, die berücksichtigt werden müssen. Generell besteht die Möglichkeit, dass die recht großen *tags* die Wechselwirkung zwischen zwei Proteinen sterisch behindern. Außerdem kann der Einsatz eines cytoplasmatisch exponierten *tags* den Transport eines an der inneren Kernhülle lokalisierten Proteins durch die Kernpore be- oder sogar verhindern. Auch ist darauf zu achten, dass sowohl Donor als auch Akzeptor auf der gleichen Seite der Membran – also luminal oder cytoplasmatisch – orientiert sind. Demnach ist die Kenntnis der Topologie der verwendeten Membranproteine von Vorteil, andererseits lassen sich so auch vorhergesagte Topologien bestätigen. Schließlich muss beachtet werden, dass die Fusion eines *tags* an den N-Terminus eines Membranproteins mit Signalpeptid nicht möglich ist, da durch das Abspalten der Signalsequenz nach Insertion in das ER auch der Fusions-*tag* verloren gehen würde.

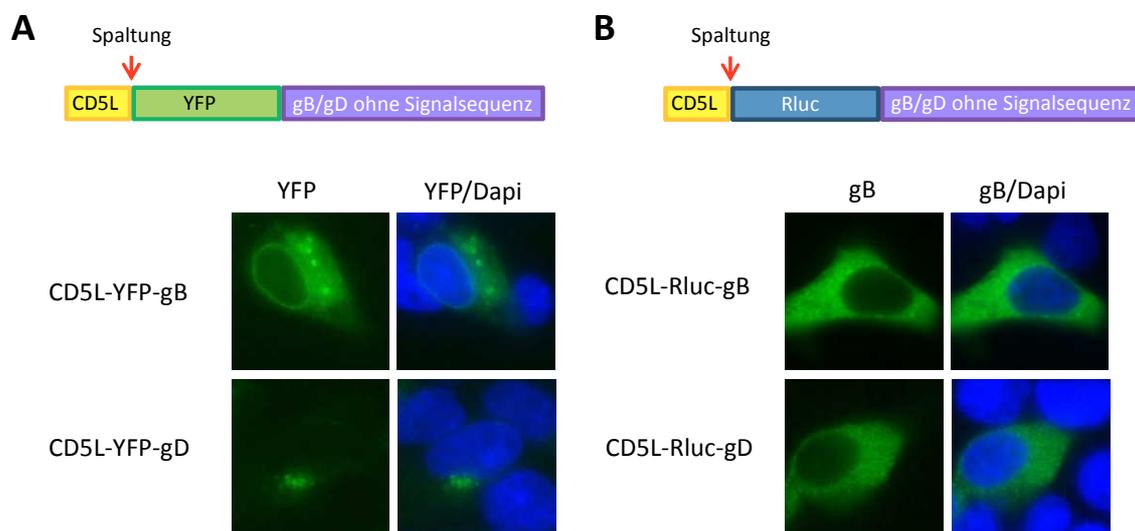


**Abbildung 4.3: Das BRET-System**

Das BRET-System (*bioluminescence resonance energy transfer*) beruht auf der Koexpression zweier potenzieller Interaktionspartner, die fusioniert an die Renilla Luciferase oder das Fluorophor YFP exprimiert werden. Die durch Substratzugabe induzierte Lichtemission der Luciferase (Akzeptor) kann auf einen in der Nähe befindlichen Donor (YFP) übertragen werden, der wiederum selbst Licht einer anderen Wellenlänge abstrahlt. Durch das Verhältnis der Lichtemissionen beider Wellenlängen kann ein Paar als interagierend oder nicht interagierend bestimmt werden.

Generell ist es möglich, das BRET-System als Hochdurchsatzmethode anzuwenden. Die oben genannten Einschränkungen bei Gebrauch von Membranproteinen erschweren allerdings den Einsatz dieser Methode zur Validierung der mittels Y2H generierten intraviralen Interaktionsdaten. Zunächst sollten die Gateway-kompatiblen BRET-Vektoren so modifiziert werden, dass der Einsatz von Signalpeptid-tragenden Membranproteinen möglich ist. Dazu wurde mittels *nested* PCR die kodierende Sequenz eines Signalpeptids *upstream* der entsprechenden *tag*-Sequenz eingefügt.

Hierfür wurde die sogenannte *leader* Sequenz des T-Zell-Oberflächenproteins CD5 (CD5L) benutzt. Wird als Insert die DNA-Sequenz eines Membranproteins ohne seine intrinsische Signalsequenz verwendet, sollte ein Fusionsprotein aus CD5L, dem entsprechenden *tag* (Rluc oder YFP) und dem Signalpeptid-freien Membranprotein exprimiert werden (siehe Abbildung 4.4). Das Signalpeptid CD5L, das die Insertion in die ER-Membran gewährleistet, wird anschließend abgespalten und der *tag* lokalisiert somit luminal. Die Lokalisierung der so generierten Fusionsproteine in HEK293-Zellen wurde mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die YFP-Fusionsproteine besitzen dabei selbst fluorogene Eigenschaften, während das Rluc-Fusionsprotein durch die Verwendung von spezifischen Antikörpern und sekundären Reagenzien sichtbar gemacht wurde. Der Zellkern wurde mit DAPI angefärbt. Als repräsentatives Beispiel ist die Lokalisierung der Glykoproteine B (gB) und D (gD) dargestellt (siehe Abbildung 4.4). Das Prinzip des Transfers der Signalsequenz funktioniert gut mit dem YFP-*tag*, da alle getesteten Typ-I Membranproteine, die zur Membraninsertion ein Signalpeptid benötigen, eine deutliche Lokalisierung meist am Golgi-Apparat, aber auch am ER und der Plasmamembran zeigen. Der CD5L-YFP-Vektor könnte also für das BRET-System benutzt werden. Dies ist jedoch für den CD5L-Rluc-Vektor nicht zutreffend. Keines der untersuchten Fusionsproteine wurde in die ER-Membran inseriert, stattdessen waren alle im Cytoplasma diffus verteilt.

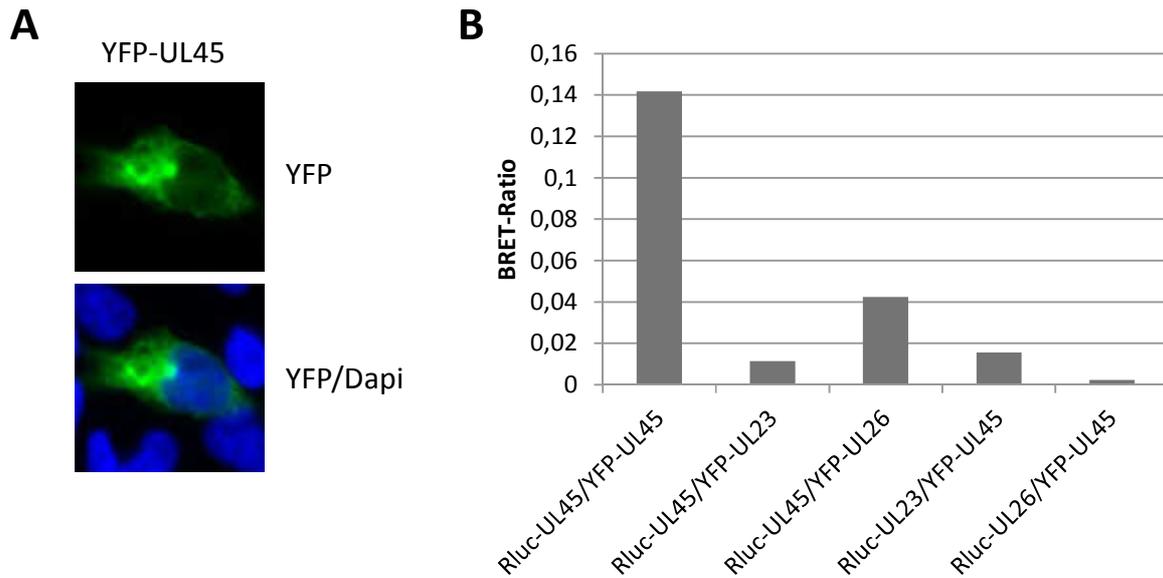


**Abbildung 4.4: Modifizierung der BRET-Vektoren**

Die kodierende Signalpeptid-Sequenz von CD5 (CD5L) wurde mittels PCR in *upstream*-Orientierung zu den N-terminalen *tags* (YFP bzw. Rluc) der BRET-Vektoren eingefügt. Bei Verwendung von Membranproteinsequenzen ohne intrinsische Signalsequenz sollte das Fusionsprotein während der Transkription in die ER-Membran inseriert werden (A und B, schematische Darstellung). Dort erfolgt die Abspaltung von CD5L, und der *tag* lokalisiert luminal. (A) Die Insertion eines Fusionsproteins aus CD5L-YFP und Glykoprotein B (gB) bzw. Glykoprotein D (gD) wurde in transfizierten HEK293-Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie überprüft. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. (B) Die Fusionsproteine aus CD5L-Rluc und gB bzw. gD werden nicht in die Membran inseriert und lokalisieren nach exogener Expression diffus cytoplasmatisch. Zur Visualisierung wurden polyklonale anti-gB bzw. anti-gD Antikörper sowie sekundäre Reagenzien verwendet.

Durch die oben beschriebenen Einschränkungen des BRET-Systems war nur ein sehr kleiner Anteil des durch Y2H-Analyse gewonnenen Datensatzes für eine Validierung mittels BRET geeignet (siehe 3.3.7.2). Die Gateway-Kompatibilität der BRET-Vektoren ermöglichte ein einfaches Umsetzen der benötigten Insertsequenzen aus der HSV-1 pDONR207-Kollektion. Nach Kotransfektion der entsprechenden Vektorpaare in Duplikaten wurden die HEK293-Zellen 48 h inkubiert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Die Induktion der Luciferase-Aktivität erfolgte durch Zugabe des Substrats Coelenterazin (30 µM), nach 2 min wurde die YFP-Emission bei 535 nm und die Luciferase-Emission bei 485 nm über einen Zeitraum von 10 sec detektiert. Die BRET-Ratio R eines jeden Proteinpaares ermittelte sich nun aus dem Verhältnis von YFP- zu Luciferase-Signal und wird durch die Subtraktion eines Korrekturfaktors cf normalisiert ( $R = (I_{535\text{ nm}}/I_{485\text{ nm}}) - cf$ ). Dieser Korrekturfaktor wird aus dem Verhältnis von  $I_{535\text{ nm}}/I_{485\text{ nm}}$  eines Luciferase-Kontrollproteins ermittelt und dient dazu, das „Durchbluten“ des Luciferase-Signals in den YFP-Kanal zu bestimmen. Als interne Positivkontrolle dient die Expression eines Fusionsproteins aus Rluc und YFP, bei dem ein vollständiger Energietransfer stattfindet und eine BRET-Ratio von 1 erreicht wird.

Bei den meisten getesteten Paaren dieser Studie war die Intensität der Luciferase zu niedrig, um eine Auswertung treffen zu können. Daraus lässt sich ableiten, dass es für die Verwendung des BRET-Systems mit Membranproteinen individueller Protokolloptimierung für die jeweiligen Paarungen bedarf, die den Umfang dieser Arbeit überschreiten würde. Allerdings konnte an einem Beispiel das Potenzial dieses Systems gezeigt werden. Im Y2H-Screen wurden mit dem luminalen Fragment des Typ-II Proteins pUL45 (UL45A) als *prey*-Fusionsprotein einige Interaktionsdaten generiert, die auf Grund ihrer gegensätzlichen Membranlokalisierung im physiologischen Kontext nicht möglich sind. Des Weiteren wurde eine Selbstinteraktion von pUL45 über seine luminal Domäne festgestellt. Zunächst wurde die Lokalisierung von YFP-UL45 in transfizierten HEK293-Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie kontrolliert und eine Golgi- und Plasmamembran-ähnliche Färbung beobachtet (siehe Abbildung 4.5 A). Anschließend konnte im BRET-Assay die Selbstinteraktion von pUL45 bestätigt werden (siehe Abbildung 4.5 B). Im Säulendiagramm ist die BRET-Ratio für die jeweiligen Paarungen dargestellt. Die Paarung von YFP-UL45 und Rluc-UL45 erreicht einen methodenspezifischen Schwellenwert über 0,1 und kann damit als positiv beurteilt werden. Die potenziellen, aber physiologisch unmöglichen Interaktionen der luminalen Domäne von pUL45 mit den nukleoplasmatisch lokalisierten Proteinen pUL26 und pUL28 werden in beiden möglichen Kombinationen als negativ bestätigt. Dies unterstützt einerseits die Aussortierung von per Lokalisierung unmöglichen Interaktionspaaren aus dem Y2H-Datensatz, und zeigt andererseits die Stärken des BRET-Systems zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen *in situ*.

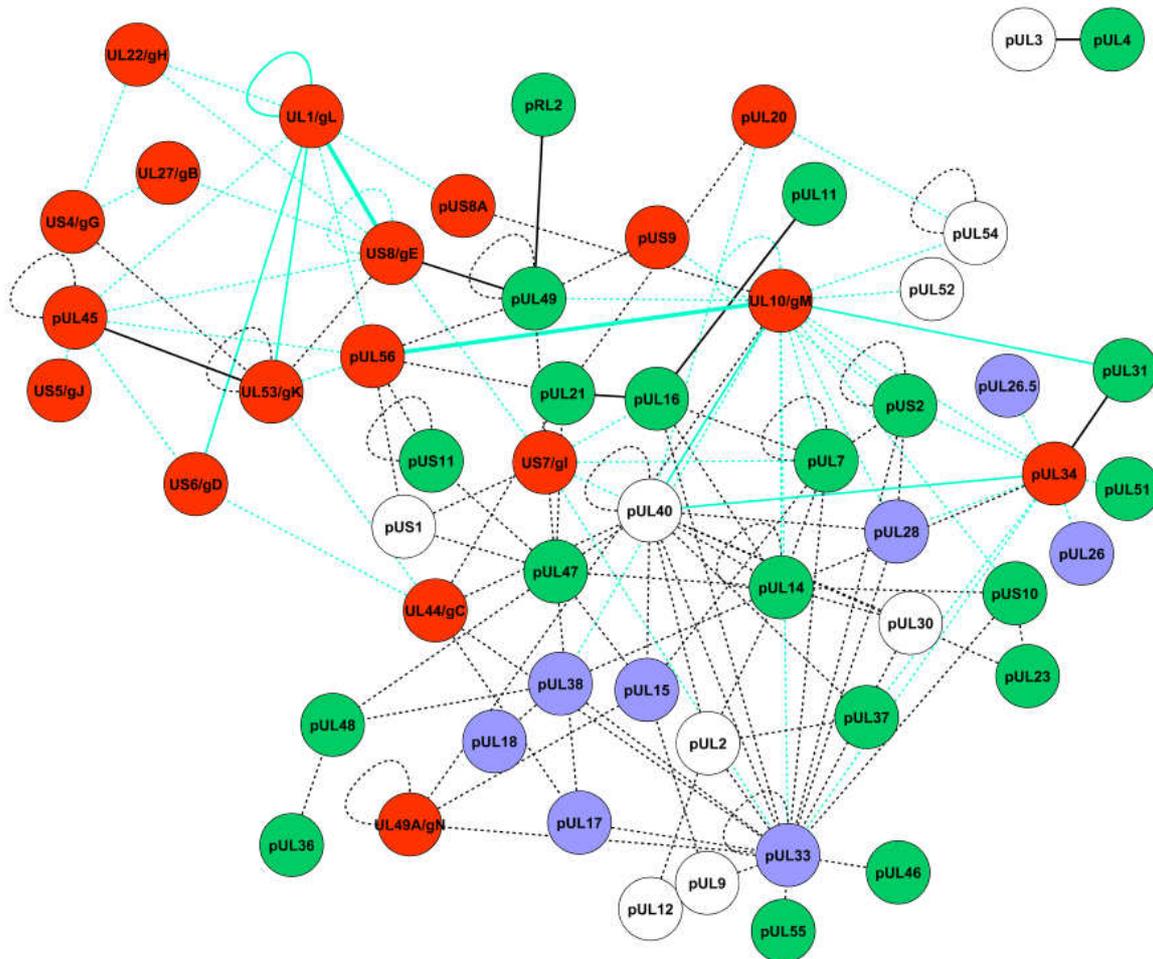


**Abbildung 4.5: HSV-1 pUL45 bildet Homooligomere**

(A) Die subzelluläre Lokalisierung des Fusionsproteins YFP-UL45 wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz in HEK293-Zellen mikroskopisch überprüft. Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. (B) Die BRET-Ratio wurde 48 h nach Kontransfektion der entsprechenden Vektorpaare in lebenden HEK293-Zellen in Duplikaten bestimmt. Die Zugabe von Coelenterazin induziert die Luciferaseaktivität, Lichtemissionen werden bei 535 nm (YFP) und 48 nm (Rluc) gemessen. Die BRET-Ratio errechnet sich aus dem Verhältnis von  $I_{535 \text{ nm}}/I_{485 \text{ nm}}$ , das durch einen Korrekturfaktor (Rluc-Kontrolle) normalisiert wird. Dieser korrigiert das „Durchbluten“ des Luciferase-Signals in den YFP-Kanal.

#### 4.1.4 Integration der Interaktionsdaten der HSV-1 Membranproteine in das bestehende intravirale Netzwerk

Die mittels Matrix-basiertem Y2H-Screen neu generierten Interaktionsdaten der HSV-1 Membranproteine konnten nun in das bereits vorhandene intravirale Interaktom des Herpes simplex-Virus 1 eingepflegt werden (Fossum *et al.*, 2009; Schmidt, 2009). Wie in 4.1.2 sind die Proteine als Knoten und ihre Interaktionen als Verbindungslinien zwischen ihnen dargestellt. Die einzelnen Proteine sind je nach Strukturzugehörigkeit farblich markiert (rot = Membran, blau = Capsid, grün = Tegument). Weiße Knoten können keiner dieser morphologischen Strukturen zugeordnet werden und stehen für Proteine, die meist enzymatische oder genregulatorische Funktionen besitzen. Blaue *edges* markieren die durch diese Arbeit neu hinzugekommenen Proteininteraktionen, während schwarze *edges* die PPI des vorangegangenen Screens markieren. Die Linienstärke repräsentiert dabei die Stärke der Interaktion (gestrichelt = unidirektional, solide = bidirektionale oder mit mehreren Fragmenten identifizierte Interaktion (zweifach und dreifach)).



**Abbildung 4.6: Das Interaktom von HSV-1**

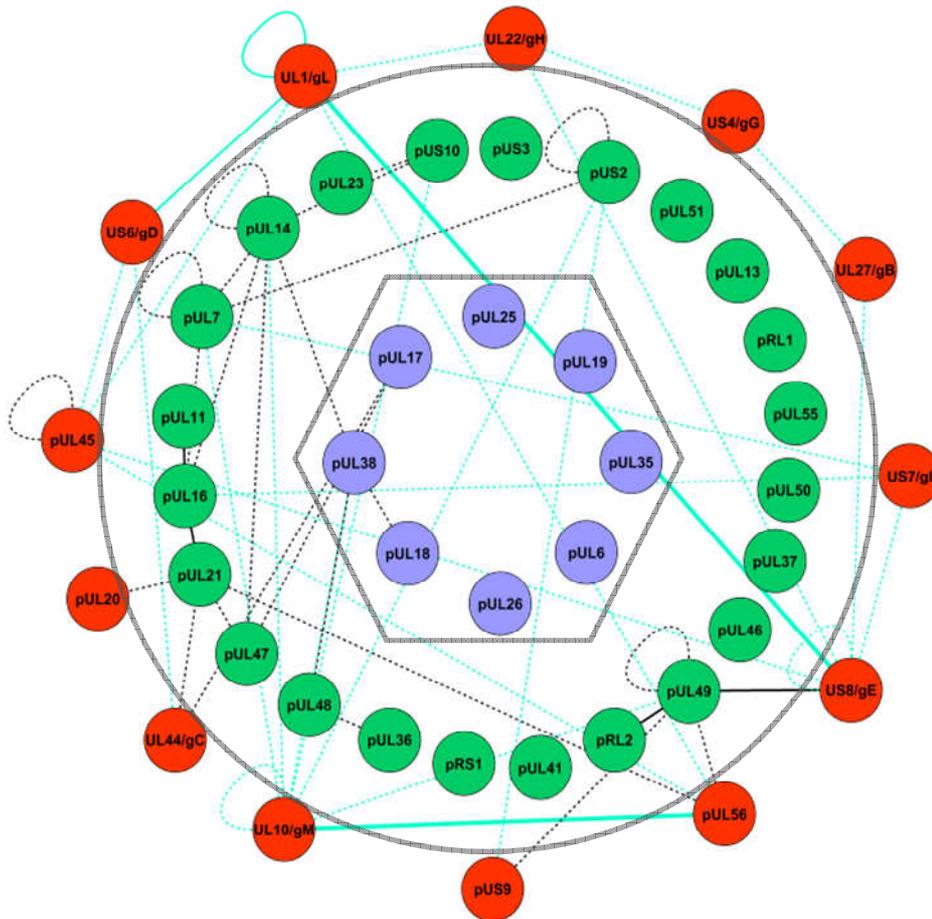
Die in dieser Studie generierten Y2H-Daten (blaue Linien) wurden mit dem zuvor publizierten HSV-1 Interaktom (Fossum *et al.*, 2009; Schmidt, 2009) vereinigt. Proteine sind als Knoten (rot = Membranproteine, grün = Tegument, blau = Capsid, weiß = enzymatische oder genregulatorische Proteine) und Y2H-Interaktionen als Linien dargestellt (unidirektional = gestrichelt; bidirektional oder mit verschiedenen Fragmenten identifiziert = solide (zwei- und dreifach)).

Das erweiterte Interaktom von HSV-1 besteht nun aus 55 Knoten, die durch 133 Verbindungslinien, also Protein-Protein-Interaktionen, miteinander verbunden sind (siehe Abbildung 4.6 und Anhang 7.2.2). Davon sind 52 Interaktionen durch den Y2H-Screen in dieser Studie identifiziert worden (blaue *edges*), wovon wiederum 48 durch Literaturvergleich als neu zu betrachten sind. Die Topologie dieses erweiterten Netzwerkes besitzt ähnliche Eigenschaften wie zuvor, lediglich die durchschnittliche Anzahl an Nachbarn erhöht sich von 3,2 auf 4,3 und die charakteristische Pfadlänge wird um 0,5 auf 2,7 reduziert. Mit Hilfe dieser Studie konnte das HSV-1 Interaktom um neun Knotenidentitäten erweitert werden, die zuvor keine Interaktion gezeigt hatten. Dabei handelt es sich teilweise um Membranproteine (gD, gH, gB und gL), aber auch um andere virale Komponenten (pUL52, pUL54, das Tegumentprotein pUL51 sowie die Capsidproteine pUL26 und pUL26.5). Die Unterteilung in luminale und cytoplasmatische Interaktionen ist nicht mehr so deutlich wie im Interaktom der HSV-1

Membranproteine (siehe Abbildung 4.2), da beide „Module“ nun untereinander stärker vernetzt sind. Auch dieses Netzwerk ist nicht unbedingt als *scale-free* zu bezeichnen, da unterproportional wenige Knoten, nämlich 14, einen Verknüpfungsgrad von 1 besitzen. Dafür gibt es viele hochverknüpfte Knoten, das Capsidprotein pUL33 erreicht dabei den maximalen Verknüpfungsgrad von 20. Generell hilft eine solche grafische Darstellung dabei, sich einen ersten Überblick über die Wechselwirkungen der HSV-1 Proteine untereinander zu verschaffen. Dadurch lassen sich auch leicht hochvernetzte *hubs* identifizieren, die möglicherweise eine wichtige Funktion während der Virusreplikation erfüllen. Einen solchen *hub* stellt das Glykoprotein M dar, das 18 Interaktionen vor allem mit Tegument- und Capsidproteinen eingeht.

#### 4.1.5 Das intravirale Interaktom im physiologischen Kontext

Darüber hinaus bietet ein solches Netzwerk die Möglichkeit, Proteininteraktionsdaten mit anderen Studien zu kombinieren. So ist es beispielsweise von Interesse, die Wechselwirkungen der Proteine untereinander so darzustellen, wie sie im reifen Viruspartikel und damit im physiologischen Kontext vorkommen. Dadurch werden die Interaktionen zwischen den einzelnen Strukturkomponenten - also Membranproteine, Tegument und Capsid – sichtbar, wie sie sich während des sekundären und finalen Umhüllungsschritts an TGN-Vesikeln abspielen könnten. Dazu wurde die massenspektrometrische Analyse reifer HSV-1 Partikel herangezogen (Loret *et al.*, 2008) und mit den Y2H-Interaktionsdaten des erweiterten Interaktoms kombiniert (siehe Anhang 7.2.2; fett markierte Paare). In Abbildung 4.7 ist das extrazelluläre Virus schematisch dargestellt und mit dem intraviralen Netzwerk überlagert. Darin befinden sich nur noch solche Proteine, die im reifen Partikel vorkommen. Die Capsidproteine (blau) bilden die innerste Schicht gefolgt von Tegumentproteinen (grün) in der Mitte und Membranproteinen (rot) außen. Blaue Verbindungslinien zeigen die in dieser Studie identifizierten Y2H-Interaktionen an. Dieses Modell konnte vor allen Dingen um PPI der Membranproteine erweitert werden. Alle 13 im reifen Partikel enthaltenen Membranproteine gehen vor allem Wechselwirkungen untereinander, besonders aber auch mit Tegumentproteinen ein. Für insgesamt zehn Proteine des Teguments bzw. fünf Capsidproteine wurden keine PPI gefunden. Eine solch schematisch angeordnete Übersicht der intraviralen Interaktionen im reifen Partikel bzw. während der sekundären Umhüllung vereinfacht die Identifizierung interessanter und womöglich funktional relevanter Knotenpunkte. Auch im physiologischen Kontext besitzt das Glykoprotein M, das vor allem mit Tegumentproteinen interagiert, eine scheinbare Schlüsselfunktion.



**Abbildung 4.7: Das HSV-1 Interaktom im physiologischen Kontext**

Die Y2H-Daten des erweiterten HSV-1 Interaktoms wurden mit einer massenspektrometrischen Analyse reifer Viruspartikel (Loret *et al.*, 2008) kombiniert. Das Virus ist schematisch dargestellt und mit den Komponenten des reifen Partikels sowie ihren Proteininteraktionen überlagert. Innen befinden sich die Capsidproteine (blau), in der Mitte liegen die Tegumentproteine (grün) und außen die Membranproteine (rot). Die in dieser Studie identifizierten Interaktionen sind als blaue Linien dargestellt.

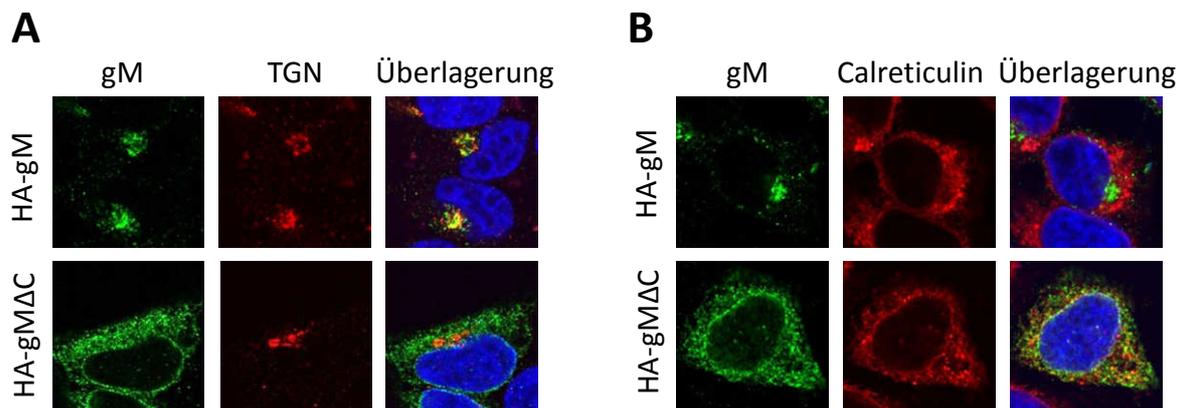
## 4.2 Glykoprotein M: Funktionelle Charakterisierung der cytoplasmatisch exponierten Domäne

Der intravirale Matrix-basierte Hefe-2-Hybrid-Screen der HSV-1 Membranproteine (siehe 4.1) identifizierte das Glykoprotein M (gM) als hochverknüpften *hub*, das mit Komponenten von sowohl Capsid als auch Tegument und Hüllmembran interagiert. Da die Interaktionspartner unter Verwendung der extramembranären C-terminalen Domäne von gM gefunden wurden, sollte die Funktionalität dieser Domäne näher untersucht werden.

### 4.2.1 Der Transport von HSV-1 gM zu TGN-Membranen geschieht unabhängig von *trafficking*-Motiven der C-terminalen Domäne

Eine Funktion der großen, cytoplasmatisch exponierten C-terminalen Domäne des Typ-III Membranproteins gM von HSV-1 (siehe 2.2.3.1) im intrazellulären Proteintransport von gM gilt als wahrscheinlich. Um ihren Einfluss auf die Lokalisierung von gM zu untersuchen, wurde die subzelluläre Verteilung von gM im Vergleich zu einer um die C-terminale Domäne verkürzten Variante (gM $\Delta$ C) mittels indirekter Immunfluoreszenz (IF) untersucht. HeLa-Zellen wurden mit den entsprechenden Plasmiden (pCR3-N-HA-UL10 und -UL10 $\Delta$ C) transfiziert und 20 h später der indirekten Immunfluoreszenzfärbung (siehe 3.3.8.1) unterworfen. Die Fusionsproteine wurden mit anti-HA Antikörpern dekoriert, zum Vergleich wurden Markerproteine des *trans*-Golgi Netzwerkes (anti-TGN46) bzw. des endoplasmatischen Retikulums (ER, anti-Calreticulin) sichtbar gemacht. Zur Visualisierung wurden Fluorochrom-gekoppelte Sekundärantikörper verwendet, die DNA im Zellkern wurde mit DAPI angefärbt. Wie bereits zuvor beschrieben (Crump *et al.*, 2004), lokalisierte gM unabhängig von anderen viralen Faktoren hauptsächlich am TGN, was durch eine Überlagerung der anti-HA und anti-TGN Signale sichtbar wurde (Abbildung 4.8. A). Im Gegensatz dazu zeigte gM $\Delta$ C keine Kolokalisierung mit dem TGN-Marker, sondern vielmehr eine ER-ähnliche Verteilung (siehe Abbildung 4.8. A). Die Lokalisierung von gM $\Delta$ C am ER konnte durch die teilweise Überlagerung mit der Calreticulin-Färbung bestätigt werden (Abbildung 4.8. B). Tatsächlich erhält gM $\Delta$ C keinen Zutritt zum Golgi-Apparat, sondern verbleibt im ER, wie ein Experiment zur Endoglykosidase H-Sensitivität (EndoH) der beiden Fusionsproteine zeigen konnte (Jie Zhang, Montréal; Striebinger *et al.*, 2011 (submitted)). EndoH spaltet nur die einfachen Oligosaccharide, die von Membranproteinen im ER erworben werden, nicht jedoch Golgi-gereifte komplexere Formen. HeLa-Zelllysate wurden 24 h nach der Transfektion (pCR3-N-HA-UL10 und -UL10 $\Delta$ C) mit EndoH inkubiert und mittels SDS-PAGE und nachfolgendem Western Blot analysiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte, aber transfizierte Zelllysate. Beim Vergleich der Migrationsbanden von HA-gM vor und nach EndoH-Behandlung ergab

sich kaum ein Unterschied, d.h. gM trug durch den Golgi-Apparat modifizierte N-Glykosylierungen, die durch EndoH nicht gespalten werden konnten (Daten hier nicht gezeigt). Die Bande von HA-gM $\Delta$ C wurde allerdings durch die Endo-H-Behandlung in eine schneller migrierende Bande konvertiert, was einer Sensitivität für EndoH entspricht. Auf biochemischem Weg konnte so bestätigt werden, dass gM $\Delta$ C keinen Zugang zum Golgi-Apparat erhält.

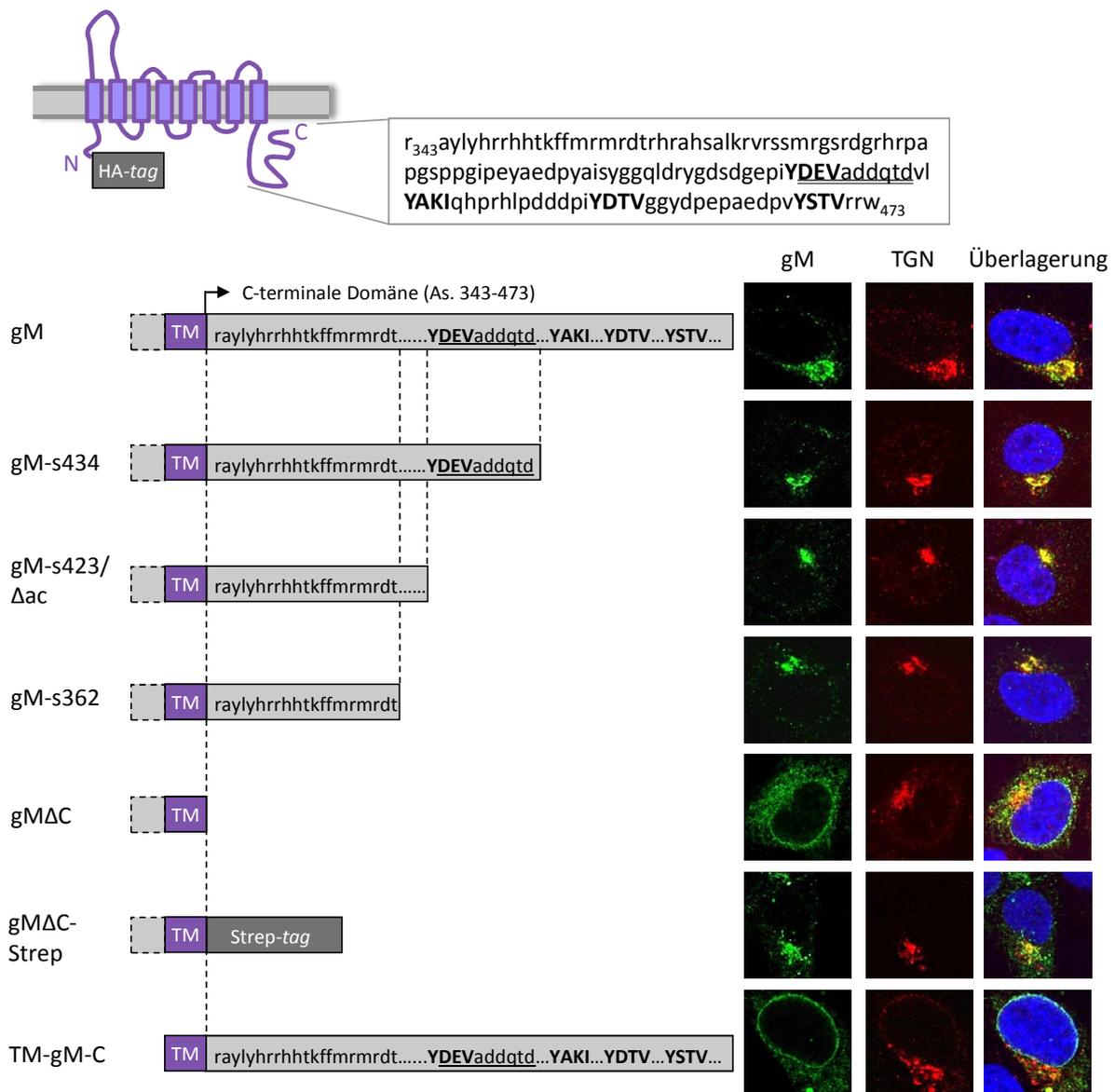


**Abbildung 4.8: Subzelluläre Lokalisierung von HA-gM und HA-gM $\Delta$ C**

HeLa-Zellen wurden mit den Plasmiden pCR3-N-HA-UL10 bzw. -UL10 $\Delta$ C transfiziert und die Lokalisierung der HA-Fusionsproteine mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung (IF) überprüft. Zum Vergleich wurden Marker des *trans*-Golgi Netzwerkes (anti-TGN46, in (A)) und des endoplasmatischen Retikulums (ER, anti-Calreticulin, in (B)) verwendet. Die Färbung erfolgte mittels Fluorochrom-gekoppelter Sekundärantikörper, die zelluläre DNA wurde mit DAPI markiert.

Die C-terminale Domäne von gM enthält mehrere potenzielle YXX $\phi$ -Motive (Y = Tyrosin, X = Aminosäure jeglicher Art,  $\phi$  = hydrophobe Aminosäure mit sperriger Seitenkette) sowie eine Häufung saurer Aminosäuren (*acidic cluster*). Die YXX $\phi$ -Motive dienen klassischerweise als Signalmotive für die Proteinsortierung von Membranproteinen in Verbindung mit Clathrin-bedeckten Vesikeln (Bonifacino und Traub, 2003). Gerade im Zusammenhang mit Herpesviren wird jedoch auch eine Beteiligung der Tyrosin-basierten Motive in Kombination mit einem *acidic cluster* am Transport zwischen ER und Golgi-Apparat postuliert (Favoreel, 2006). Um den Einfluss der cytoplasmatisch exponierten C-terminalen Domäne auf die Auswanderung aus dem ER bzw. den Golgi-Transport von gM zu untersuchen, wurde die Lokalisierung sequenziell verkürzter HA-gM-Mutanten mittels IF wie oben beschrieben untersucht (siehe Abbildung 4.9). Zur Expression in HeLa-Zellen wurden alle gM-Mutanten als pCR3-N-HA-Konstrukte kloniert. Die schrittweise Deletion der potenziellen *trafficking*-Motive (YXX $\phi$ -Motive und *acidic cluster*) durch die Insertion eines Stoppcodons an der bezeichneten Aminosäurenposition verhinderte die Anreicherung von gM am TGN nicht (HA-gM-s434, HA-gM-s423/ $\Delta$ ac und HA-gM-s362). Die unmittelbar auf die letzte TM-Domäne folgenden 20 Aminosäuren (HA-gM-s362) waren dabei für die Lokalisierung am TGN ausreichend. Um zu überprüfen, ob diese

Minimalsequenz unbekannte *trafficking*-Motive enthält, wurde sie durch ein Strep-*tag* ersetzt (HA-gMΔC-Strep). Auch bei dieser gM-Mutante war der Transport zum Golgi-Apparat nicht gestört.



**Abbildung 4.9: Subzelluläre Lokalisierung von gM-Mutanten**

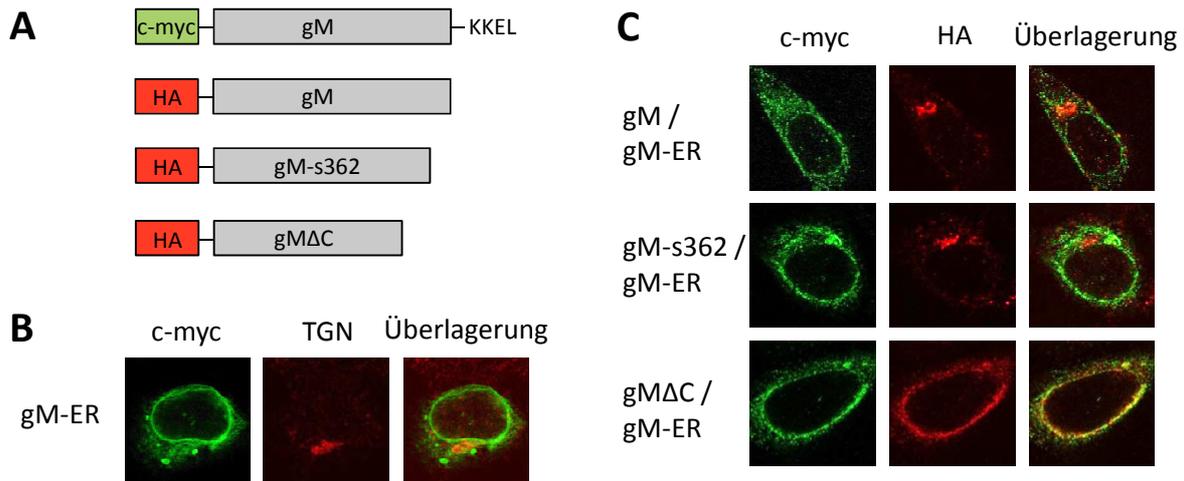
Die Mitwirkung potenzieller *trafficking*-Motive am ER-Export/Golgi-Transport von gM wurde mittels sequenzieller Deletionsmutanten und IF getestet. Die vier möglichen YXX $\phi$ -Motive (in Großbuchstaben) und das *acidic cluster* (ac, unterstrichen) wurden durch das Einfügen von Stoppcodons an der genannten Aminosäureposition deletiert (HA-gM-s434, HA-gM-s423/Δac und HA-gM-s362). Außerdem wurde die Sequenz der cytoplasmatisch exponierten C-terminalen Domäne durch ein Strep-*tag* ersetzt (gMΔC-Strep) bzw. zusammen mit seiner Transmembrandomäne (TM) an ein Signalpeptid zur ER-Insertion fusioniert (TM-gM-C). Auch die Lokalisierung von gM bzw. gMΔC ist dargestellt. Alle Konstrukte sind mit einem N-terminalen HA-*tag* versehen, so dass ihre subzelluläre Verteilung mit anti-HA-Antikörpern verfolgt werden konnte. Zum Vergleich wurde das *trans*-Golgi Netzwerk (TGN) mit Hilfe eines Markerproteins sichtbar gemacht. Zur Visualisierung dienten Fluorochrom-gekoppelte Sekundärantikörper und DAPI-Färbung der Zellkerne.

Die Bestätigung, dass die cytoplasmatische Domäne alleine für den Golgi-Transport nicht ausreichend ist, wurde mit einem neuen Konstrukt demonstriert. Der Vektor pIN-G (McKeown *et al.*, 2006), der für einen *trafficking* Reporter kodiert, wurde so modifiziert, dass ein Fusionsprotein aus einem Signalpeptid zur ER-Insertion (*Igk-leader*), dem N-terminalen HA-tag und der letzten TM-Domäne von gM zusammen mit der cytoplasmatischen Domäne exprimiert wird (TM-gM-C). Auch hier wurde die Lokalisierung des Fusionsproteins mit Hilfe von IF dokumentiert (siehe Abbildung 4.9). Es zeigte eine ER-typische Lokalisierung und keine Kolokalisierung mit dem TGN-Marker. Zusammenfassend deuten die Befunde darauf hin, dass die gM-Mutante ohne cytoplasmatisch exponierte C-terminale Domäne (gM $\Delta$ C) zwar in ihrer Fähigkeit zum Verlassen des ERs bzw. Transport zum Golgi-Apparat gestört ist, die in dieser Domäne enthaltenen potenziellen *trafficking*-Motive allerdings entweder nicht am Golgi-Transport beteiligt oder aber nicht ausreichend sind, was auf weitere Transportmotive im N-terminalen Bereich von gM schließen lässt.

#### 4.2.2 HSV-1 gM bildet keine Homooligomere

Die strenge Qualitätskontrolle im ER verhindert den Export fehlgefalteter Proteine. Eine fehlerhafte Faltung kann u.a. durch die Abwesenheit einer Oligomer-Bildung hervorgerufen werden und darüber hinaus die Etablierung bzw. Entmaskierung von Transportmotiven verhindern. Die mittels Y2H gefundene Selbstinteraktion der cytoplasmatischen Domäne von gM (siehe 4.1) weist auf eine mögliche Homooligomerisierung von gM hin. Daher sollte überprüft werden, ob der fehlende Transport zum TGN der um die cytoplasmatische Domäne verkürzten Mutante gM $\Delta$ C durch eine ausbleibende Oligomerisierung von gM $\Delta$ C verursacht wird.

Zunächst wurde ein Konstrukt im pCR3-N-c-myc-Vektor generiert, das gM mit einem Signal zum ER-*retrieval* (KKEL) am C-Terminus kodiert (gM-ER, siehe Abbildung 4.10 A). Die Rückführung dieses Fusionsproteins ins ER sowie die fehlende Kolokalisierung mit TGN-Markern wurde mittels IF 20 h nach Transfektion in HeLa-Zellen dokumentiert (siehe Abbildung 4.10 B). Um zu ermitteln, ob eine Homooligomerisierung von gM stattfindet, wurde gM-ER zusammen mit HA-Fusionsproteinen von gM oder den C-terminal verkürzten gM $\Delta$ C und gM-s362 koexprimiert (siehe Abbildung 4.10 C). Zur Visualisierung mit Hilfe von IF dienten Primär- und Sekundärantikörper wie bereits beschrieben. Die Golgi-Lokalisierung von gM und gM-s362 wurde in Anwesenheit von gM-ER nicht verhindert. Lediglich die im ER residente Mutante gM $\Delta$ C zeigte eine Kolokalisierung mit gM-ER. Daraus lässt sich ableiten, dass gM bei transienter Expression keine Homooligomere bildet und dies auch nicht für den Transport zum Golgi-Apparat benötigt. Demnach ist es unwahrscheinlich, dass die Retention von gM $\Delta$ C im ER durch dessen Unvermögen zur Oligomerisierung zustande kommt.



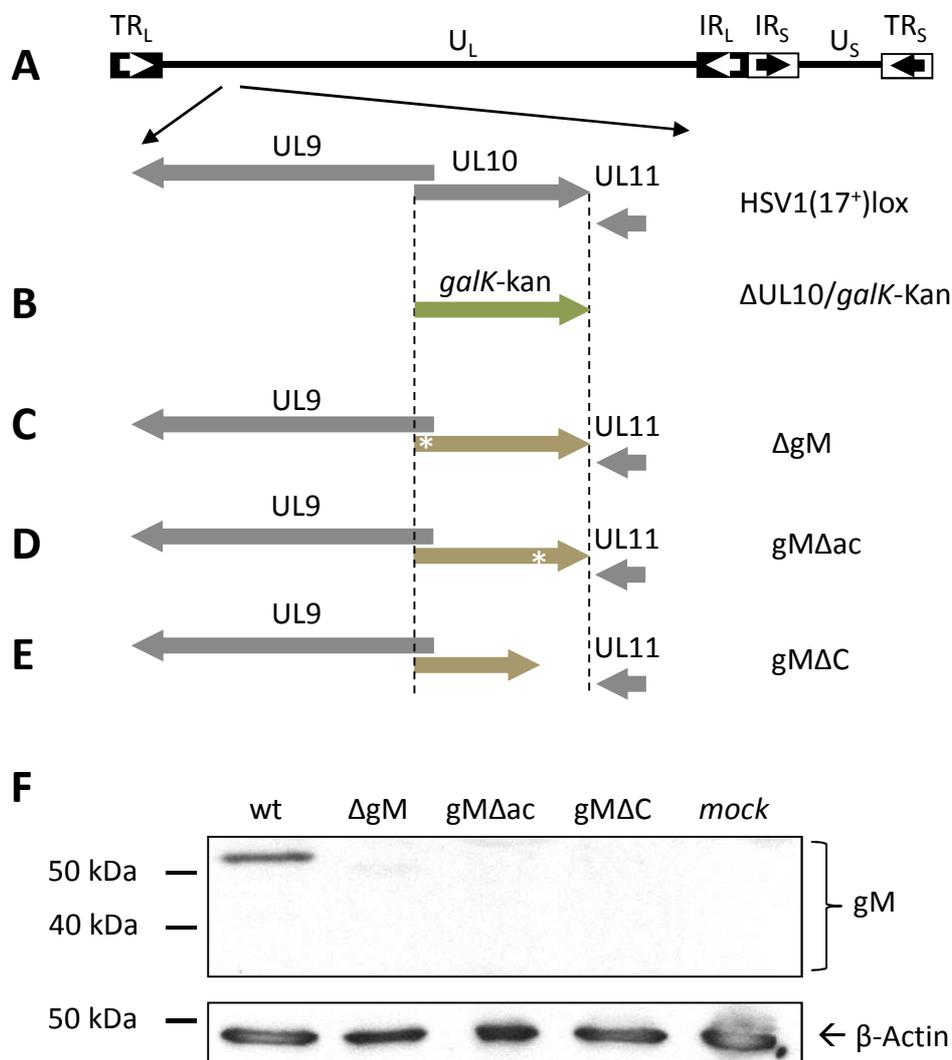
**Abbildung 4.10: HSV-1 gM bildet keine Homooligomere**

(A) Schematische Darstellung der verwendeten Fusionsproteine. Das mit einem ER-retrieval Signal ausgestattete gM-ER besitzt einen N-terminalen c-myc-tag, während gM, gM-s362 und gMΔC fusioniert an einen HA-tag exprimiert werden. (B) Das Fusionsprotein mit ER-retrieval Signal (gM-ER) lokalisiert hauptsächlich am ER. (C) Durch Koexpression von gM-ER mit gM, gM-s362 oder gMΔC wurde überprüft, ob eine Oligomerisierung von gM für den Transport zum TGN notwendig ist. Für die IF wurden Primär- und Sekundärantikörper wie bereits beschrieben verwendet.

#### 4.2.3 BAC-Mutagenese von UL10 (gM)

Die Bedeutung der cytoplasmatischen Domäne von gM bzw. des Golgi-Transports von gM im Replikationszyklus von HSV-1 sollte auch im viralen Kontext untersucht werden. Dazu wurden mittels BAC-Mutagenese (siehe 3.3.4.6) drei neue gM-Virusmutanten hergestellt (z.T. freundlicherweise durchgeführt von Melanie Ott, München). Zunächst wurde das gM-codierende Gen UL10 im BAC pHSV1(17<sup>+</sup>)lox durch die *galk*-kan (*gk*) Kasette ersetzt (siehe Abbildung 4.11 A und B). Zur Amplifizierung der *gk*-Kasette mit flankierenden homologen Sequenzen zu UL10 wurden die Primer H5-gM/*gk* und H3-gM/*gk* verwendet. Da die ORFs von UL9 und UL10 überlappen, wurden dabei auch die ersten 56 kodierenden Basenpaare von UL9 deletiert. Die *gk*-Kasette wurde anschließend gegen drei verschiedene Fragmente ausgetauscht. Das erste kodiert UL10 mit einer Stopppmutation an Aminosäureposition 3 (Abbildung 4.11 C, ΔgM), so dass die Expression von gM durch einen sehr frühen Translationsabbruch von UL10 verhindert wird, während gleichzeitig die Aminosäuresequenz von UL9 nur geringfügig verändert wird (R17H). Dieser Basenpaar-Austausch wurde durch Verwendung der Primer H5-ΔgM und H3-ΔgM erreicht. Die zweite Mutante kodiert UL10 mit einer Stopppmutation an Position 423 (Abbildung 4.11 D, gMΔc), so dass eine verkürzte Version von gM exprimiert wird, bei der alle potenziellen *trafficking*-Motive der cytoplasmatischen Domäne fehlen (siehe Abbildung 4.9). Das entsprechende Fragment wurde mit pDONR207-UL10-s423 als *template* und den Primern H5-gMΔC bzw. H3-ΔgM generiert. Bei der letzten Mutante ist die kodierende Sequenz der C-terminalen cytoplasmatischen Domäne deletiert und ein Stoppcodon nach Position

342 angefügt (Abbildung 4.11 E, gMΔC). Hier wurden zur Amplifizierung die Primer H5-gMΔC und H3-gMΔC sowie pDONR207-UL10ΔC als *template* verwendet.



**Abbildung 4.11: Herstellung von HSV-1 gM-Mutanten**

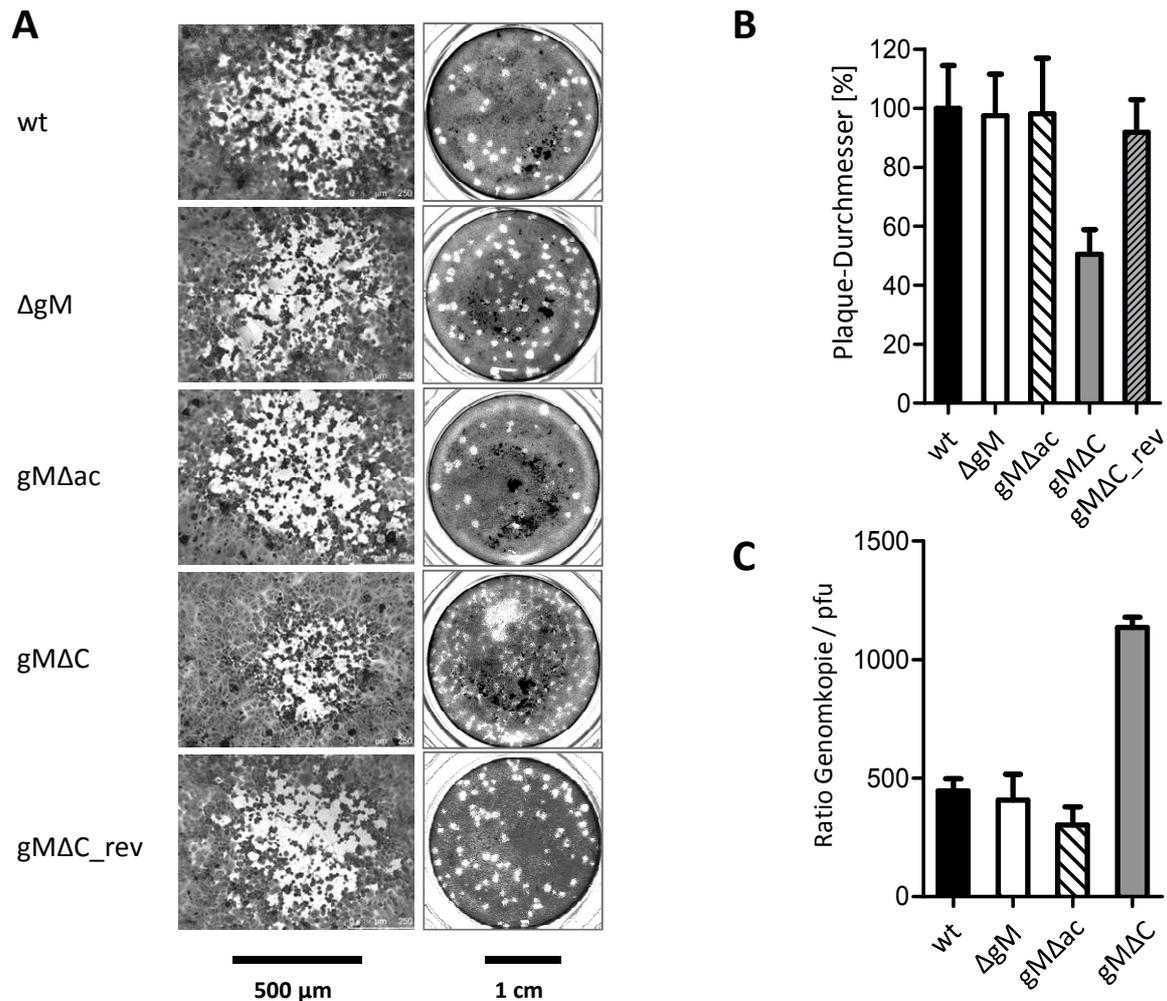
(A-E) Schematische Darstellung der BAC-Mutagenese. Zunächst wurde die UL10-Sequenz im *bacterial artificial chromosome* (BAC) HSV1(17<sup>+</sup>)lox durch homologe Rekombination gegen eine *galk-kan*-Kassette ausgetauscht (A und B). Diese wurde anschließend mit drei verschiedenen mutierten Sequenzen von UL10 ersetzt. Nach der Virus-Rekonstitution entstehen daraus HSV-1 Mutanten, die entweder gM mit einem Stoppcodon an Position 3 (C, Sternchen, HSV-1  $\Delta gM$ ) bzw. an Position 423 (D, Sternchen, HSV-1  $gM\Delta ac$ ) kodieren oder eine Deletion der C-terminalen Domäne besitzen (E, HSV-1  $gM\Delta C$ ). (F) Die Deletion von gM bzw. dessen Verkürzungen in den entsprechenden HSV-1 Mutanten wurde in infizierten Vero-Zelllysaten mittels SDS-PAGE und Western Blot überprüft. Die Expression von Wildtyp-gM wurde mit einem Antikörper detektiert, der die C-terminale Domäne von gM spezifisch bindet. Zur Kontrolle wurde der Expressionstatus von  $\beta$ -Actin ermittelt und ein nicht-infiziertes Zelllysate (*mock*) verwendet.

Um die korrekte Insertion der mutierten Zielgene zu überprüfen, wurde zunächst ein DNA-Restriktionsverdau mit *XhoI* durchgeführt und das Restriktionsmuster mit dem der Positivkontrolle (pHSV1(17<sup>+</sup>)lox) und Negativkontrolle (pHSV1(17<sup>+</sup>)lox- $\Delta UL10/gk$ ) verglichen. Anschließend wurde

mittels DNA-Sequenzierung der Erfolg der BAC-Mutagenese bestätigt. Die Virus-Rekonstitution wurde durch Transfektion der mutierten BAC-DNA in Vero Zellen durchgeführt (Passage 1, P1) und der so gewonnene Virusstamm erneut vermehrt (Passage 2, P2, siehe 3.3.4.1). Diese P2-Generation der Virusmutanten wurde für alle folgenden Experimente verwendet. Die Deletion von gM in allen drei neuen HSV-1 Mutanten wurde durch SDS-PAGE und nachfolgendem Western Blot von infizierten Vero-Zelllysaten gezeigt (Abbildung 4.11 F). Der spezifisch an die cytoplasmatische Domäne von gM bindende Antikörper erzeugt nur beim HSV-1 Wildtyp-Lysat (wt) eine charakteristische Bande von ca. 50 kDa, nicht jedoch bei den HSV-1 Mutanten  $\Delta$ gM, gM $\Delta$ ac und gM $\Delta$ C. Zur Kontrolle wurde nicht-infiziertes Lysat benutzt (*mock*) und der Expressionsstatus von  $\beta$ -Actin ermittelt. Zur Visualisierung wurden sekundäre Peroxidase-gekoppelte Antikörper verwendet.

#### 4.2.4 Die Mutante HSV-1 gM $\Delta$ C zeigt einen inhibitorischen Phänotyp

Um die Wachstumseigenschaften der drei neuen HSV-1 Mutanten zu bestimmen, wurden zunächst Vero-Zellen in Triplikaten mit HSV-1  $\Delta$ gM, gM $\Delta$ ac und gM $\Delta$ C sowie Wildtyp (wt) als Kontrolle infiziert und drei Tage später die Größe der entstandenen Plaques mikroskopisch bestimmt. In Abbildung 4.12 A sind links einzelne Plaques in 100-facher Vergrößerung und rechts zur Übersicht Bilder der dazugehörigen 24-*well*-Vertiefung dargestellt. Die durchschnittliche Größe der Plaques von HSV-1  $\Delta$ gM und gM $\Delta$ ac gleichen dem Wildtyp, während der Durchmesser der von HSV-1 gM $\Delta$ C gebildeten Plaques deutlich reduziert ist (Abbildung 4.12 B). Um auszuschließen, dass der Phänotyp von HSV-1 gM $\Delta$ C nicht unspezifisch verursacht wird, wurde eine Revertante von gM $\Delta$ C produziert (gM $\Delta$ C<sub>rev</sub>). Dazu wurde analog wie oben beschrieben der verkürzte ORF UL10C erneut erst mit der *gk*-Kassette und anschließend mit dem Volle-Länge-ORF ersetzt (freundlicherweise durchgeführt von Verena Raschbichler, München). Die daraus resultierende Revertante erzeugte wieder Plaques von wt-ähnlicher Größe (siehe Abbildung 4.12 A und B). Die Bildung stark verkleinerter Plaques wird demnach spezifisch durch die Deletion der C-terminalen Domäne von gM hervorgerufen (gM $\Delta$ C-Mutante) und weist auf einen Defekt der Virusausbreitung auf Nachbarzellen (*cell-to-cell-spread*) hin. Um diesen Effekt genauer zu untersuchen, wurde der Gehalt an HSV-1 Genomkopien und infektiöser Partikel im Überstand infizierter Zellen 30 h nach Infektion (30 h.p.i.) in Triplikaten bestimmt (MOI 0,1). Dazu wurde die quantitative PCR (qRT-PCR) bzw. Titration mittels *Plaque-Assay* eingesetzt und das Verhältnis der Genomkopien zu *plaque forming units* (pfu) errechnet (Abbildung 4.12 C). Die Ratio von HSV-1  $\Delta$ gM und gM $\Delta$ ac ähnelt erneut dem Wildtyp, bei HSV-1 gM $\Delta$ C ist dieses Verhältnis jedoch stark erhöht, was eine verminderte Produktion infektiöser Partikel impliziert.



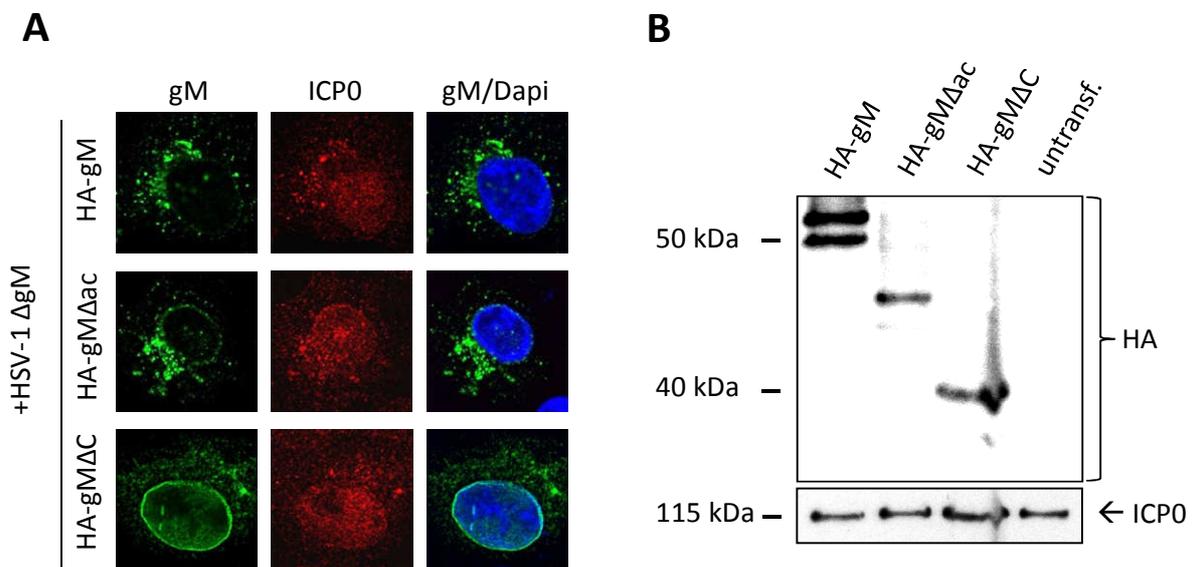
**Abbildung 4.12: HSV-1 gMΔC zeigt einen inhibitorischen Phänotyp**

(A) Durch die Infektion von Vero-Zellen mit HSV-1 wt, ΔgM, gMΔac und gMΔC sowie deren Revertante gMΔC\_rev gebildete Plaques wurden drei Tage nach Infektion mikroskopisch ausgemessen. Links ist die 100-fache Vergrößerung einzelner Plaques und rechts die Übersicht der dazugehörigen 24-well-Vertiefung dargestellt. (B) Grafik von Mittelwert und Standardabweichung der gemessenen Plaque-Durchmesser in Prozent. (C) Überstände infizierter Vero-Zellen (MOI 0,1) wurden 30 h.p.i. in Triplikaten auf HSV-1 Genomgehalt (qRT-PCR) und Anzahl infektiöser Partikel (Titration durch *Plaque Assay*) überprüft. Das Verhältnis von Genomkopien zu *plaque forming units* (pfu) ist als Säulendiagramm mit Standardabweichungen dargestellt.

#### 4.2.5 Im viralen Kontext verbleibt gMΔC im ER

Das Glykoprotein M lokalisiert während der HSV-1 Infektion an unterschiedlichen zellulären Membrankompartimenten wie Kernmembranen, TGN und Plasmamembran (Baines und Roizman, 1993; Crump *et al.*, 2004; Wills *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009). Daher sollte die Lokalisierung von gM und der beiden C-terminal verkürzten Mutanten gMΔac bzw. gMΔC auch im viralen Kontext überprüft werden. Dazu wurden sie mit einem HA-tag versehen in Vero-Zellen exprimiert und die Zellen 26 h nach Transfektion mit dem gM-Deletionsvirus HSV-1 ΔgM infiziert (MOI 1). Die subzelluläre Verteilung der Fusionsproteine in infizierten Zellen wurde 12 h.p.i. mittels IF durch

Verwendung von HA-spezifischen Antikörpern sowie sekundären Reagenzien beobachtet, anti-ICP0 Antikörper dienten dabei als Infektionskontrolle (siehe Abbildung 4.13 A). Sowohl HA-gM als auch HA-gM $\Delta$ ac zeigte in infizierten Zellen eine konzentrierte Lokalisierung in Kernnähe, die typisch für eine Golgi-Färbung ist. Im Gegensatz dazu konnte für HA-gM $\Delta$ C eine ER-ähnliche Verteilung beobachtet werden, die im Einklang mit der zuvor ermittelten Retention im ER nach transientscher Transfektion steht. Demnach führt die Deletion der C-terminalen Domäne von gM sowohl in transfizierten als auch in infizierten Zellen zum gleichen Phänotyp. Dies zeigt, dass der Verlust der Transportfähigkeit von gM $\Delta$ C zum Golgi-Apparat durch den viralen Kontext nicht kompensiert wird.



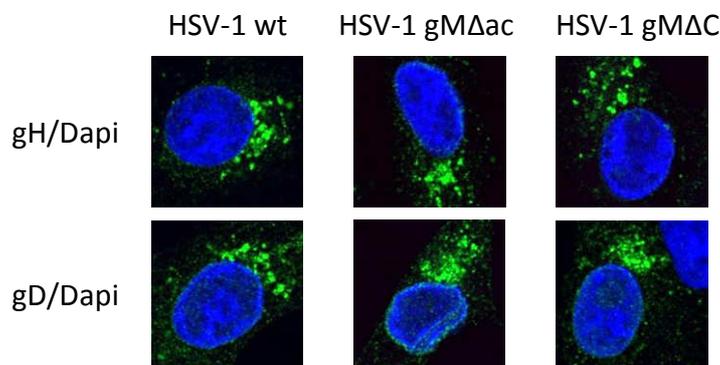
**Abbildung 4.13: Im viralen Kontext verbleibt gM $\Delta$ C im ER**

(A) Die Lokalisierung von HA-gM, HA-gM $\Delta$ ac und HA-gM $\Delta$ C wurde in Vero-Zellen, die mit der gM-Deletionsmutante (HSV-1  $\Delta$ gM) infiziert wurden, untersucht. 26 h nach Transfektion wurden die Zellen mit einer MOI von 1 infiziert und nach weiteren 12 h wie bereits beschrieben mittels IF analysiert. Als Infektionsmarker dienten anti-ICP0-Antikörper. (B) Zellysate eines Parallelansatzes wurden mit Hilfe von SDS-PAGE und Western Blot auf Stabilität der Fusionsproteine untersucht. Zur Detektion wurden HA- und ICP0-spezifische Antikörper sowie sekundäre Reagenzien verwendet.

Die Stabilität der HA-Fusionsproteine wurde in einem Parallelansatz mittels SDS-Page und nachfolgendem Western Blot von transfizierten und infizierten Vero-Zellysaten überprüft (siehe Abbildung 4.13 B). Die Detektion mittels anti-HA Antikörpern und sekundären Reagenzien erzeugte eine spezifische Doppelbande von HA-gM etwas über 50 kDa, wie sie auch in vorangegangenen Experimenten beobachtet wurde. Die verkürzten Mutanten HA-gM $\Delta$ ac und HA-gM $\Delta$ C migrierten als einfache Bande in der erwarteten Höhe von ca. 47 und 40 kDa. In keiner Spur sind Anzeichen von Proteindegradation zu erkennen. Die Detektion von ICP0 diente als Infektionsmarker.

#### 4.2.6 Die Lokalisierung viraler Glykoproteine wird durch die Deletion der cytoplasmatischen Domäne von gM nicht beeinflusst

Die transiente Expression von gM legt eine Beteiligung an der Relokalisierung von gD und gH sowie zellulärer Faktoren von der Plasmamembran zum Golgi-Apparat nahe (Crump *et al.*, 2004). Um zu untersuchen, ob die Deletionen der cytoplasmatischen Domäne von gM die subzelluläre Verteilung von gD und gH beeinflussen, wurden HeLa-Zellen mit HSV-1 gM $\Delta$ ac und gM $\Delta$ C infiziert (12 h.p.i., MOI 1) und die Lokalisierung der beiden viralen Glykoproteine mittels gH- bzw gD-spezifischer Antikörper, wie bereits beschrieben, überprüft. Bei der HSV-1 Mutante gM $\Delta$ ac fehlen die YXX $\phi$ -Motive der C-terminalen Domäne von gM (siehe 4.2.1), die an der Internalisierung herpesviraler Membranproteine durch Clathrin-Vesikel und somit an ihrer Ansammlung am Ort der sekundären Umhüllung beteiligt sein könnten (Favoreel, 2006), während bei HSV-1 gM $\Delta$ C keine Lokalisierung von gM $\Delta$ C am TGN beobachtet wurde. Die Infektion mit HSV-1 wt diente im Vergleich zu den C-terminal verkürzten Mutanten als Kontrolle (Abbildung 4.14). Bei allen verwendeten Virusstämmen war die Lokalisierung von gD und gH jedoch vergleichbar und zeigte eine Golgi-ähnliche Färbung. Dementsprechend wird die Verteilung der beiden Glykoproteine zum Golgi-Apparat weder durch die Deletion der cytoplasmatischen Domäne noch der Tyrosin-basierten Motive beeinflusst.

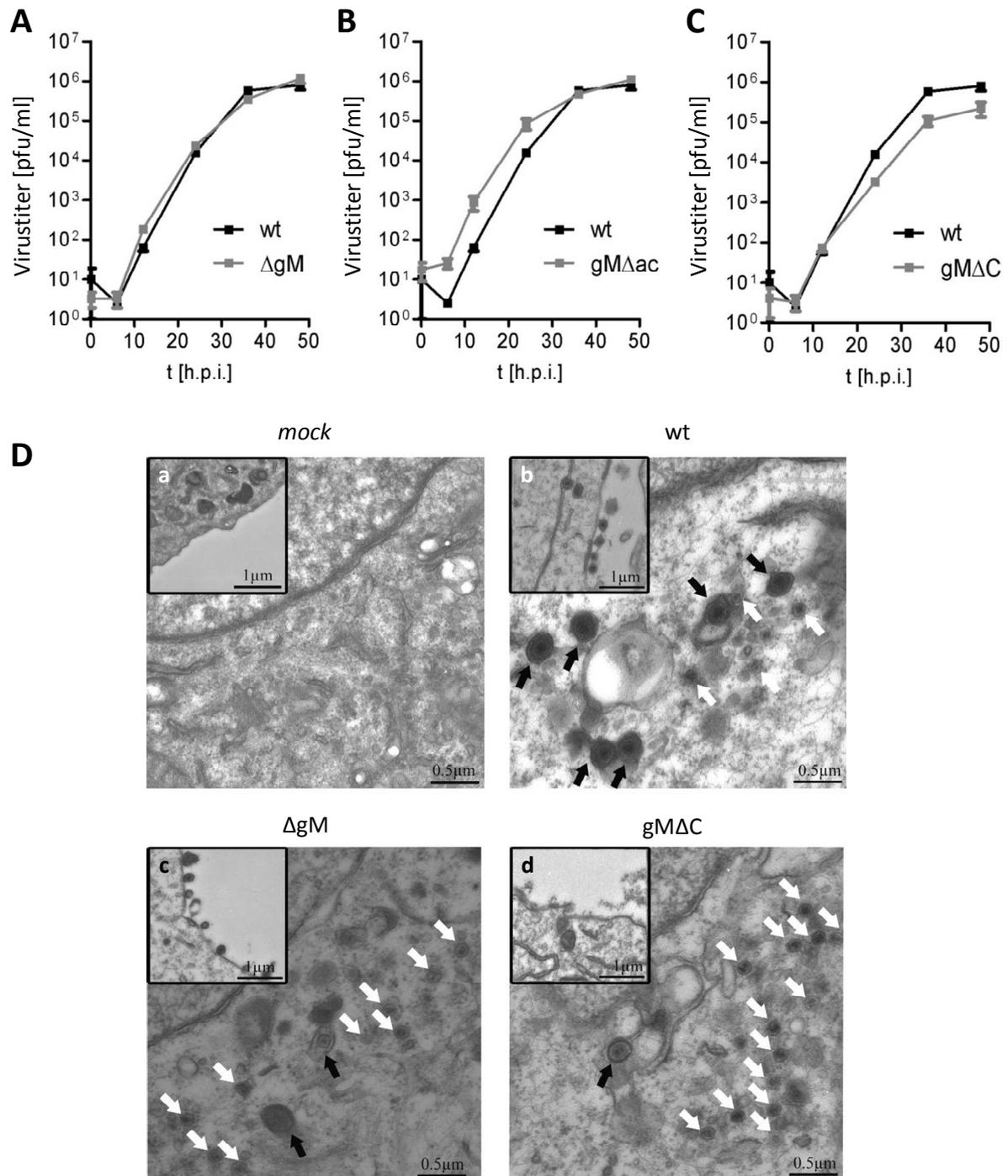


**Abbildung 4.14: Subzelluläre Verteilung viraler Glykoproteine im Kontext von HSV-1 Mutanten**

Die subzelluläre Verteilung der viralen Glykoproteine gD und gH der C-terminal verkürzten Mutanten HSV-1 gM $\Delta$ ac und gM $\Delta$ C wurde im Vergleich zur wt-Infektion mittels IF untersucht (MOI 1, Vero-Zellen, 12 h.p.i). Zur Visualisierung wurden spezifische anti-gD und anti-gH-Antikörper sowie sekundäre Reagenzien verwendet, die Zellkerne wurden mittels DAPI gefärbt.

#### 4.2.7 Die Deletion der C-terminalen Domäne von gM reduziert die Effizienz der HSV-1 Replikation

Die Replikationskinetik der drei neuen HSV-1 Mutanten  $\Delta$ gM, gM $\Delta$ ac und gM $\Delta$ C wurde mit *one-step* Virus-Wachstumskurven analysiert. Zu diesem Zweck wurden die Überstände infizierter Vero-Zellen (MOI 0,1) in Triplikaten zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und mittels *Plaque* Assay titriert.



**Abbildung 4.15: Replikationskinetik der HSV-1 Mutanten**

(A-B) Die Wachstumseigenschaften von HSV-1  $\Delta$ gM (A), gM $\Delta$ ac (B) und gM $\Delta$ C (C) wurden im Vergleich zum Wildtyp bestimmt. Die Überstände infizierter Vero-Zellen (MOI 0,1) wurden in Triplikaten zu den angegebenen Zeitpunkten gesammelt und mittels *Plaque Assay* titriert. (D) Die Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) von nicht-infizierten (*mock*) bzw. mit HSV-1 wt,  $\Delta$ gM sowie gM $\Delta$ C infizierten BHK-21-Zellen wurde von der Arbeitsgruppe von Roger Lippé (Université de Montréal) durchgeführt. Die kleinen Bildeinsätze zeigen die An- oder Abwesenheit extrazellulärer Viruspartikel (a-d), während in den großen Bildern umhüllte (schwarze Pfeile) und nicht-umhüllte Capside (weiße Pfeile) im Cytoplasma markiert sind.

Parallel zu vorherigen Ergebnissen zeigen HSV-1  $\Delta$ gM und gM $\Delta$ ac ein ähnliches Wachstumsverhalten wie der Wildtyp (siehe Abbildung 4.15. A und B). Die HSV-1 Mutante mit der deletierten cytoplasmatischen Domäne (gM $\Delta$ C) ist allerdings in der Freisetzung infektiöser Partikel signifikant verzögert (Abbildung 4.15 C). Diese Beobachtung konnte bei Verwendung verschiedener Zelltypen (Vero, BHK-21 und 143-B) bestätigt werden und ist bei höherer MOI sogar noch ausgeprägter (Jie Zhang, Montréal; Striebinger *et al.*, 2011 (submitted)). Dabei ist die Anzahl extrazellulärer infektiöser Partikel um bis zu zwei Logstufen (Faktor 100) vermindert (Daten hier nicht gezeigt). Da die Reduktion der Replikation von HSV-1 gM $\Delta$ C bei den verwendeten Zelltypen variiert, scheint der inhibitorische Phänotyp dieser Mutante Zelltyp-abhängig zu sein.

Weil eine Beteiligung von gM am sekundären Umhüllungsschritt prognostiziert wird, wurden BHK-21 Zellen mit HSV-1 wt,  $\Delta$ gM und gM $\Delta$ C infiziert (MOI 1) und 16 h.p.i. mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) analysiert (AG Lippé, Montréal; Striebinger *et al.*, 2011 (submitted)). Die Bildung der Capside im Nukleus sowie das Beladen derselben mit DNA (*packaging*) war bei allen verwendeten Virusstämmen vergleichbar. Bei HSV-1 gM $\Delta$ C waren jedoch nicht-umhüllte virale Capside im Cytoplasma infizierter Zellen überrepräsentiert (siehe Abbildung 4.15 D). Die Quantifizierung dieser Ergebnisse bezeugt einen Anstieg nackter, cytoplasmatischer Capside auch bei HSV-1  $\Delta$ gM, der Befund ist jedoch für HSV-1 gM $\Delta$ C wesentlich stärker. Darüber hinaus wurden bei gM $\Delta$ C-infizierten Zellen deutlich weniger Viruspartikel an der Zelloberfläche gefunden als bei HSV-1 wt oder  $\Delta$ gM (Daten hier nicht gezeigt). Zusammenfassend deuten alle diese Daten auf eine Funktion von gM bzw. seiner cytoplasmatischen Domäne als Rekrutierungsfaktor von zellulären oder viralen Komponenten zum Ort der sekundären Umhüllung hin.

### 4.3 Interaktionen der zellulären ESCRT-Maschinerie mit HSV-1

Die zelluläre ESCRT-Maschinerie (*endosomal sorting complex required for transport*) induziert Knospungsereignisse an der Endosomenmembran, so dass intraluminale Vesikel (ILV) in sogenannten *multivesicular bodies* (MVB) entstehen (Raiborg und Stenmark, 2009). Dieser Vorgang dient üblicherweise der lysosomalen Proteindegradation von Membranproteinen. Einige Viren, wie z.B. HIV-1 (Morita und Sundquist, 2004), bedienen sich Teilen der ESCRT-Maschinerie, um die Knospung und damit Umhüllung der Viruspartikel an der Plasmamembran zu bewerkstelligen. Verschiedene Studien legen nahe, dass an der finalen Umhüllung von HSV-1 auch einige ESCRT-Komponenten beteiligt sind (Calistri *et al.*, 2007; Crump *et al.*, 2007; Pawliczek und Crump, 2009).

### 4.3.1 Test der ESCRT-Proteine auf Autoaktivierung (Hefe-2-Hybridsystem)

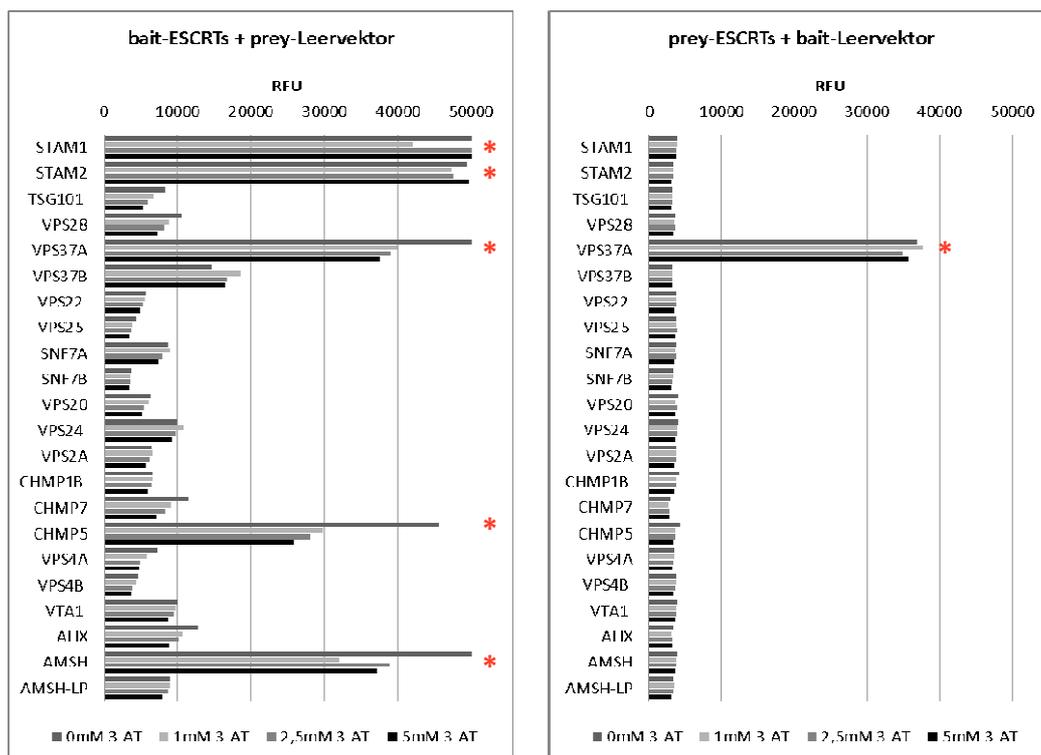
Um zu überprüfen, ob zwischen HSV-1 Proteinen und Komponenten der ESCRT-Maschinerie Protein-Protein-Interaktionen (PPI) stattfinden, sollten Matrix-basierte Hefe-2-Hybrid *Screens* durchgeführt werden (siehe 3.3.7.1.1). Dazu wurden zunächst Gateway-kompatible Donorvektoren, die die kodierenden Sequenzen von 22 ESCRT-Proteinen sowie assoziierten Proteinen enthalten, aus der *mammalian gene collection* (MGC; Rual *et al.*, 2004) entnommen (siehe Tabelle 4.3).

**Tabelle 4.3: Für Y2H-Screens verwendete ESCRT-Proteine**

Protein	Typ	Autoaktivierend in Y2H
STAM1	ESCRT-0	als <i>bait</i>
STAM2	ESCRT-0	als <i>bait</i>
TSG101	ESCRT-I	-
VPS28	ESCRT-I	-
VPS37A	ESCRT-I	als <i>bait</i> und <i>prey</i>
VPS37B	ESCRT-I	-
VPS22	ESCRT-II	-
VPS25	ESCRT-II	-
SNF7A	ESCRT-III	-
SNF7B	ESCRT-III	-
VPS20	ESCRT-III	-
VPS24	ESCRT-III	-
VPS2A	ESCRT-III	-
CHMP1B	ESCRT-III verwandt	-
CHMP7	ESCRT-III verwandt	-
CHMP5	ESCRT-III verwandt	leicht als <i>bait</i>
VPS4A	Abbau ESCRT-III Komplex	-
VPS4B	Abbau ESCRT-III Komplex	-
VTA1	Abbau ESCRT-III Komplex	-
ALIX	Modulatorische Funktion	-
AMSH	Deubiquitinierendes Enzym, interagiert mit ESCRT-0 und STAM1	als <i>bait</i>
AMSH-LP	Deubiquitinierendes Enzym	-

Die Umsetzung der Inserts in die *bait*- und *prey*-Vektoren des Hefe-2-Hybridsystems (Y2H) erfolgte mittels LR-Clonase (freundlicherweise durchgeführt von Marcus Heinzmann, München). Um die ESCRT-Proteine auf eine mögliche Autoaktivierung der Y2H-Reportergene zu überprüfen, wurde zuerst ein Vortest durchgeführt. Dazu wurden die ESCRT-Hefevektoren jeweils in Kombination mit dem entsprechenden Leervektor analog zum Y2H-Screening in Flüssigmedien auf Reporterogenaktivität getestet. Nach *Mating* und Diploidenselektion erfolgte der Transfer in Dreifach-

Selektivmedium (SD-LWH), das 4-MuX und verschiedene Konzentrationen des HIS3-Inhibitors 3-AT enthielt (0 mM, 1 mM, 2.5 mM und 5 mM). Die Reportergene *HIS3* und *MEL1* erlauben das Wachstum in Histidin-freiem Medium und hydrolysieren 4-MuX zu einem fluorogenen Produkt. Die Fluoreszenzemission wurde anschließend als *relative fluorescence units* (RFU) gemessen und grafisch aufgetragen (siehe Abbildung 4.16). Insgesamt zeigten fünf *bait*-Fusionsproteine eine Autoaktivierung (Sternchen), wovon lediglich CHMP5 auf Grund einer schwächeren Ausprägung zum Y2H-Screen zugelassen wurde. Von den *prey*-Fusionsproteinen wurde nur VPS37A auf Grund von Autoaktivierung aussortiert.



**Abbildung 4.16: Test der ESCRT-Fusionsproteine auf Autoaktivierung des Y2H-Reportersystems**

Um autoaktivierende Proteine vom Matrix-basierten Y2H-Screen auszuschließen, wurde ein Vortest durchgeführt. Das Y2H-System wurde mit den ESCRT-Fusionsproteinen jeweils als *bait* und *prey* in Kombination mit den entsprechenden Leervektoren in Flüssigmedien vollzogen. Solche Proteine, die die Reporterogenaktivität ohne Interaktionspartner induzieren, sind mit roten Sternchen markiert. Die Auswertung erfolgte als Messung der *relative fluorescence units* (RFU), da das Reportergen *MEL1* das Substrat 4-MuX in ein fluorogenes Produkt umwandelt.

### 4.3.2 Identifizierung von Virus-Wirt Proteininteraktionen mittels Matrix-basiertem Hefe-2-Hybridsystem

Um mögliche Proteininteraktionen zwischen Komponenten der ESCRT-Maschinerie und HSV-1 Proteinen zu identifizieren, wurden Matrix-basierte Y2H-Screens durchgeführt. Dazu wurden 18 ESCRT-Proteine als *bait* und 21 ESCRT-Proteine als *prey*, die nicht oder nur schwach autoaktivierend

waren, gegen die entsprechende HSV-1 *prey* bzw. *bait library* (siehe Tabelle 3.9) getestet. Die Durchführung und Auswertung erfolgte wie bereits in 4.1.1 beschrieben. Die Verwendung intrinsischer Kontrollen erlaubte die zuverlässige Evaluierung der Y2H-Screens. So wurde zum Vergleich auf jeder Mikrotiterplatte eine Positivkontrolle mitgeführt (*bait*-UL34A mit *prey*-UL31), die auch bei hohen 3-AT Konzentrationen starke RFU-Signale erzeugte. Obwohl die ESCRT-Proteine zuvor schon auf Autoaktivierung getestet und dementsprechend aussortiert worden waren, wurde jeweils eine Position der Mikrotiterplatte mit dem jeweiligen Leervektor-tragenden Hefestamm besetzt, um Autoaktivierung auszuschließen bzw. bei leichter Aktivität einen Vergleichswert zu besitzen. Um die Autoaktivierung der HSV-1 Proteine zu überwachen, wurde parallel zu den Screens die HSV-1 Kollektion mit dem entsprechenden Leervektor gepaart und getestet.

Von den 22 ESCRT-Proteinen (siehe Tabelle 4.3) als *bait*-Fusionsprotein waren vier autoaktivierend und weitere 11 zeigten keinerlei Interaktion mit der HSV-1 Kollektion. Dementsprechend konnten in dieser Orientierung 55 Interaktionen mit 7 ESCRT-Proteinen identifiziert werden (siehe Tabelle 4.4). Von den *prey*-Fusionsproteinen wurde nur eines auf Grund von Autoaktivierung verworfen, während insgesamt 11 keine positiven Werte zeigten. In dieser Richtung konnten also mit 10 ESCRT-Proteinen 50 Interaktionen identifiziert werden. Der *prey*- und *bait-count* dient dabei zusätzlich zu den intrinsischen Kontrollen als Maß der Autoaktivierung. Da die Fusionsproteine der HSV-1 Kollektion immer sorgfältig auf ihre Fähigkeit zur Autoaktivierung überprüft wurden, erfolgte die Einstufung von Interaktionspartnern mit einem relativ hohen *count* trotzdem als vertrauenswürdig. Lediglich Interaktionen, die auf Grund ihrer Lokalisierung unmöglich sind (luminale Fragmente der HSV-1 Membranproteine) wurden als falsch-positiv verworfen. Interaktionen, die in beide Richtungen oder mit mehreren Fragmenten gefunden wurden, sind farbig hinterlegt. Zur besseren Übersicht sind die kodierenden Sequenzen für HSV-1 Membranproteine rot markiert und mit ihrer jeweiligen Glykoproteinbezeichnung versehen, während Tegumentkomponenten grün und Capsidbestandteile blau dargestellt sind.

**Tabelle 4.4: Y2H Interaktionen zwischen ESCRT- und HSV-1 Proteinen**

bait	prey	prey-count	prey	bait	bait-count
STAM1	autoaktivierend	-	STAM1	UL7	6
STAM2	autoaktivierend	-	STAM1	UL14	4
TSG101	UL7	4	STAM1	UL16	3
TSG101	UL10C (gM)	2	STAM1	UL34A	7
TSG101	UL14	4	STAM1	UL38	3
TSG101	UL33	5	STAM1	UL47	7
TSG101	UL35	5	STAM1	UL56N	2
TSG101	UL40A	3	STAM2	keine Interaktion	-

bait	prey	prey-count
TSG101	UL40B	2
TSG101	UL51	1
VPS28	UL3	2
VPS28	UL7	4
VPS28	UL14	4
VPS28	UL33	5
VPS28	UL35	5
VPS37A	autoaktivierend	-
VPS37B	UL3	2
VPS37B	UL7	4
VPS37B	UL14	4
VPS37B	UL15	2
VPS37B	UL26a	2
VPS37B	UL31	2
VPS37B	UL33	5
VPS37B	UL35	5
VPS37B	UL40A	3
VPS22	UL35	5
VPS25	keine Interaktion	-
SNF7A	keine Interaktion	-
SNF7B	keine Interaktion	-
VPS20	keine Interaktion	-
VPS24	keine Interaktion	-
VPS2A	keine Interaktion	-
CHMP1B	keine Interaktion	-
CHMP7	keine Interaktion	-
CHMP5	UL10 (gM)	1
CHMP5	UL33	5
CHMP5	UL49	2
CHMP5	US7B (gl)	1
VPS4A	US2	2
VPS4B	keine Interaktion	-
VTA1	UL4	1
VTA1	UL5	1
VTA1	UL7	4
VTA1	UL10C (gM)	2
VTA1	UL14	4
VTA1	UL15	2
VTA1	UL21	1
VTA1	UL23	1

prey	bait	bait-count
TSG101	UL7	6
TSG101	UL14	4
TSG101	UL34A	7
TSG101	UL36a	1
TSG101	UL47	7
VPS28	keine Interaktion	-
VPS37A	autoaktivierend	-
VPS37B	UL7	6
VPS37B	UL34A	7
VPS37B	UL35	2
VPS22	UL7	6
VPS22	UL10C (gM)	1
VPS22	UL14	4
VPS22	UL16	3
VPS22	UL26	1
VPS22	UL31	1
VPS22	UL33	1
VPS22	UL34A	7
VPS22	UL35	2
VPS22	UL36b	1
VPS22	UL38	3
VPS22	UL44 (gC)	4
VPS22	UL47	7
VPS22	UL56	4
VPS22	UL56N	2
VPS22	US10	1
VPS22	RL1	1
VPS25	UL7	6
VPS25	UL14	4
VPS25	UL34A	7
SNF7A	keine Interaktion	-
SNF7B	UL16	3
SNF7B	UL44 (gC)	4
SNF7B	UL47	7
SNF7B	UL54	1
SNF7B	UL56	4
VPS20	keine Interaktion	-
VPS24	keine Interaktion	-
VPS2A	keine Interaktion	-
CHMP1B	keine Interaktion	-

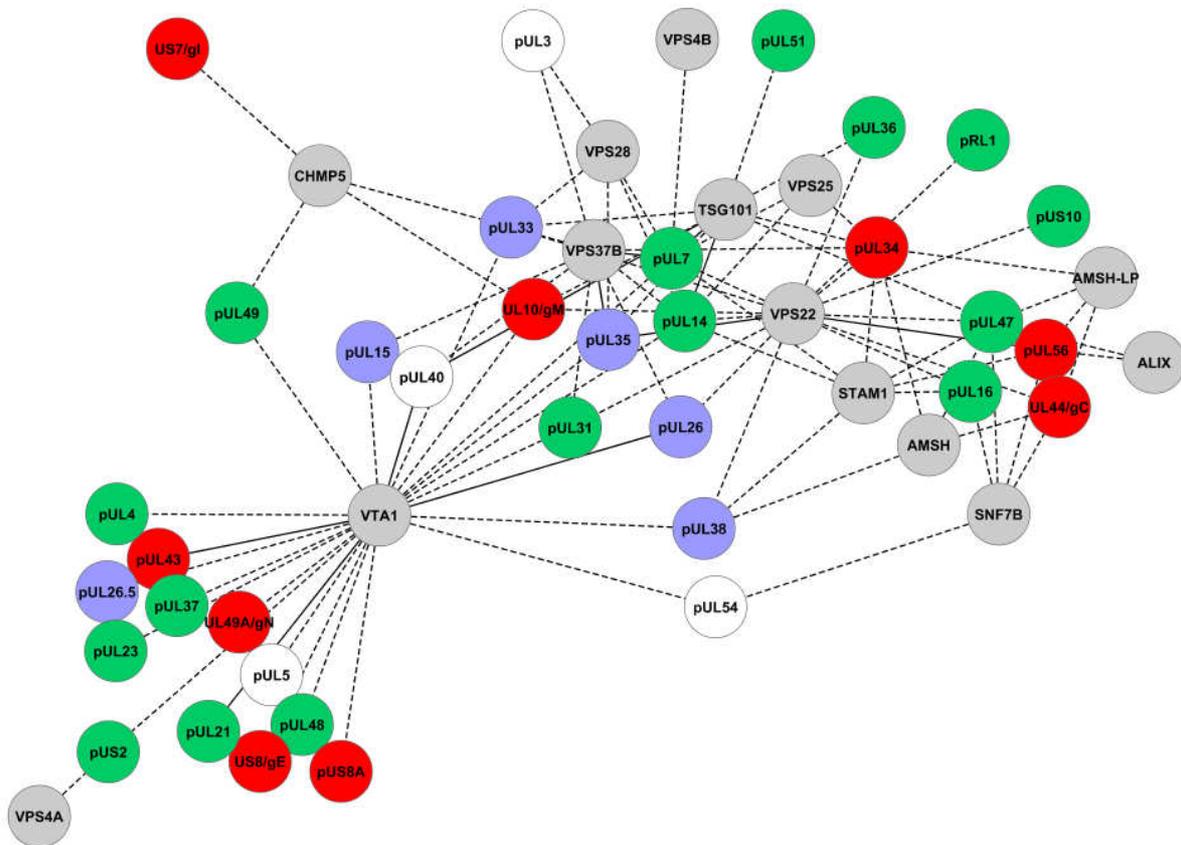
bait	prey	prey-count
VTA1	UL26a	2
VTA1	UL26b	1
VTA1	UL26.5	1
VTA1	UL31	2
VTA1	UL33	5
VTA1	UL35	5
VTA1	UL37b	1
VTA1	UL38	1
VTA1	UL40A	3
VTA1	UL40B	2
VTA1	UL43A	1
VTA1	UL43B	1
VTA1	UL48	1
VTA1	UL49	2
VTA1	UL49A-Gen (gN)	1
VTA1	US2	2
VTA1	US8B (gE)	1
VTA1	US8A-Gen	1
VTA1	UL21C	1
VTA1	UL54	1
ALIX	keine Interaktion	-
AMSH	autoaktivierend	-
AMSH-LP	keine Interaktion	-

prey	bait	bait-count
CHMP7	keine Interaktion	-
CHMP5	keine Interaktion	-
VPS4A	keine Interaktion	-
VPS4B	UL7	6
VTA1	keine Interaktion	-
ALIX	UL47	7
ALIX	UL56	4
AMSH	UL34A	7
AMSH	UL38	3
AMSH	UL44 (gC)	4
AMSH	UL47	7
AMSH-LP	UL34A	7
AMSH-LP	UL44 (gC)	4
AMSH-LP	UL47	7
AMSH-LP	UL56	4

### 4.3.3 Interaktionsnetzwerk der ESCRT-Komponenten mit HSV-1 Proteinen

Die Y2H-Daten aus Tabelle 4.4 wurden erneut so zusammengefasst, dass ein Virus-Wirt-Interaktionsnetzwerk bestehend aus ESCRT-Komponenten und den HSV-1 Proteinen gebildet werden konnte. Als interagierend identifizierte Proteinfragmente wurden ihrem jeweiligen Volle-Länge-Protein (VL) zugeordnet (z.B. UL40A und UL40B → UL40). Außerdem wurde auf die Differenzierung der Y2H-Interaktionsrichtung verzichtet. Die Membranproteine von HSV-1 wurden – falls vorhanden – mit ihrem Glykoproteinamen versehen (z.B. UL10/gM) und die restlichen Proteine mit einem „p“ als Proteinbezeichnung markiert (z.B. pUL34). Mit Hilfe der *Cytoscape-Software* (Shannon *et al.*, 2003) wurde die daraus resultierende Liste (siehe Anhang 7.3.1) zu einem grafischen Interaktionsnetzwerk aufbereitet (siehe Abbildung 4.17). Erneut sind die einzelnen HSV-1 Strukturen farblich markiert. Rote Knoten stellen Membranproteine dar, grüne Tegument- und blaue Capsidproteine, während weiße Knoten enzymatische oder genregulatorische Funktionen erfüllen.

Die Komponenten der ESCRT-Maschinerie und ihre assoziierten Proteine sind als graue Knoten dargestellt. Gestrichelte Verbindungslinien (*edges*) zeigen unidirektionale Interaktionen an, solide Linien bedeuten, dass die Interaktion entweder bidirektional oder mit zwei Proteinfragmenten eines Proteins identifiziert wurde.



**Abbildung 4.17: Virus-Wirt Interaktom von HSV-1 und der zellulären ESCRT-Maschinerie**

Die mittels Matrix-basierten Y2H-Screens gewonnenen Interaktionsdaten zwischen Komponenten der zellulären ESCRT-Maschinerie und HSV-1 Proteinen (siehe Anhang 7.3.1) wurden als grafisches Netzwerk dargestellt. HSV-1 Membranproteine sind als rote Knoten dargestellt, Tegumentproteine grün, Capsidproteine blau and Nichtstrukturproteine weiß, während zelluläre Faktoren grau eingefärbt sind. Gestrichelte Verbindungslinien repräsentieren unidirektionale Interaktionen, solide Linien stehen für bidirektionale oder mit zwei Fragmenten identifizierte Interaktionen.

Insgesamt wurden 96 Protein-Protein-Interaktionen (PPI) zwischen 14 ESCRT-assoziierten Proteinen und 35 HSV-1 Proteinen identifiziert. Analog zu den in 4.1 präsentierten intraviralen Netzwerken besitzt auch dieses Netzwerk eine ähnliche Topologie. Es gibt einige sehr hochverknüpfte *hubs* (mit einem maximalen Verknüpfungsgrad von 24 für VTA1) und die durchschnittliche Anzahl an Nachbarknotenpunkten liegt bei 3,9. Auch hier gibt es vergleichsweise wenig periphere Knoten, die einen Verknüpfungsgrad von 1 besitzen. Wird die Gradverteilung logarithmisch aufgetragen, ergibt sich eine Regressionsgerade mit relativ niedrigem Potenzkoeffizienten  $\gamma$  (0,95). Dieser Wert liegt

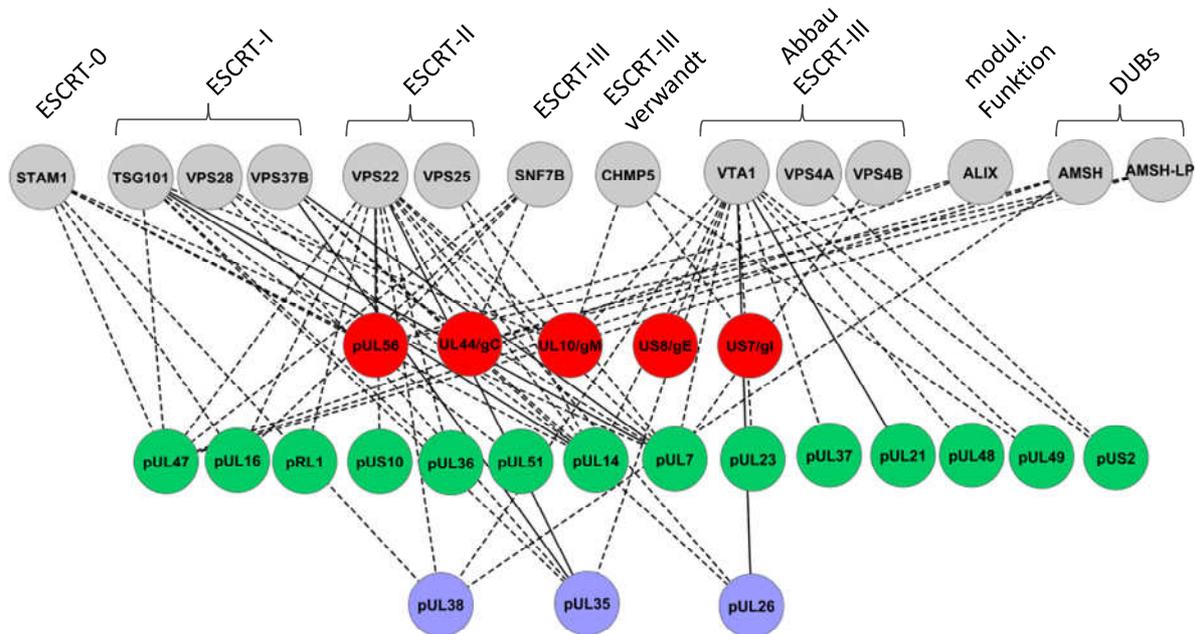
deutlich unter dem von typischen zellulären Netzwerken (üblicherweise 2-3), ist aber vergleichbar mit dem von intraviralen Netzwerken (Uetz *et al.*, 2006). Das Virus-Wirt-Netzwerk ist demnach nicht als skalenfrei zu bezeichnen. Die durchschnittliche Verknüpfung zweier beliebiger Knoten miteinander, also die durchschnittliche Pfadlänge, beziffert sich auf 2,8.

Besonders auffällig ist das offensichtlich hochvernetzte VTA1, das am Abbau des ESCRT-III Komplexes beteiligt ist. Es interagiert vor allem mit Komponenten der Tegumentschicht sowie mit Membranproteinen und scheint eine zentrale Bedeutung zu besitzen. Auf HSV-1 Proteinebene scheinen vor allem die Tegumentproteine als *hubs* eine primäre Funktion zu besitzen. Desweiteren lohnt sich die Betrachtung von TSG101 und ALIX sowie deren Interaktionspartnern. Diese beiden ESCRT-Faktoren binden virale Proteine über sogenannte *late*-Domänen (L-Domänen) (Morita und Sundquist, 2004). TSG101 wird dabei durch das P(T/S)AP-Motiv rekrutiert, während ALIX an die YP(X)<sub>n</sub>L-Domäne bindet. Viele der durch HSV-1 kodierten Proteine verfügen über eines oder sogar mehrere solcher potenziellen Bindungsmotive (Pawliczek und Crump, 2009). Von den zehn für TSG101 identifizierten Interaktoren besitzen pUL51 (PTAP<sub>230</sub>) und pUL36 (PSAP<sub>365</sub>, PTAP<sub>2803</sub>) mögliche Bindemotive. Für ALIX wurden zwei Interaktionspartner mittels Y2H identifiziert, allerdings trägt keines der beiden eine potenzielle Bindungssequenz.

#### 4.3.4 Das ESCRT-HSV-1 Netzwerk im physiologischen Kontext

Auch bei diesem Virus-Wirt-Interaktom von zellulären ESCRT-Komponenten und HSV-1 Proteinen lassen sich die gewonnenen Y2H-Daten mit anderen Studien kombinieren (siehe Anhang 7.3.1, fett markierte Paare). Die funktionale Beteiligung der ESCRT-Maschinerie wird vornehmlich für das Knospungsereignis des sekundären Umhüllungsschrittes diskutiert. Daher bietet es sich an, ein zweites Netzwerk im physiologischen Kontext zu gestalten. Dazu werden nur solche Y2H-Interaktionen verwendet, bei denen der virale Partner laut massenspektrometrischer Analyse in reife Viruspartikel eingebaut wird (Loret *et al.*, 2008). Damit reduziert sich der Datensatz auf 65 PPI zwischen 14 ESCRT-assoziierten und 22 HSV-1 Proteinen. Außerdem lassen sich die ESCRT-Proteine zu funktionalen Einheiten gruppieren. In Abbildung 4.18 ist das daraus resultierende Netzwerk stufig unterteilt dargestellt. Auf der obersten Ebene befinden sich die Knoten der ESCRT-Maschinerie (grau), von links nach rechts in der Reihenfolge der ESCRT-Untereinheiten sortiert. Proteine des ESCRT-0 Komplexes wirken an der Zusammenlagerung ubiquitinerter Frachtproteine mit, ESCRT-I und -II vermitteln zusammen die Membranknospung und ESCRT-III löst die Abschnürung des Membranhalses aus. ESCRT-III verwandte Proteine regulieren die Membranabschnürung und den Abbau von ESCRT-III, der durch VTA1 und VPS4A/B vermittelt wird. ALIX besitzt modulatorische Funktionen und deubiquitierende Enzyme (DUBs) kontrollieren durch ihre Aktivität die Sortierung

ubiquitiniertes Fracht in intraluminale Vesikel (ILV). Darunter befinden sich jeweils die Knoten der herpesviralen Membranproteine (rot), des Teguments (grün) sowie des Capsids (blau). Unidirektionale Interaktionen sind als gestrichelte Linien dargestellt, bidirektionale Interaktionen oder solche mit zwei Fragmenten desselben Proteins als solide Verbindungslinie.



**Abbildung 4.18: Virus-Wirt-Interaktom im physiologischen Kontext**

Für den physiologischen Kontext werden nur solche Proteininteraktionen beibehalten, bei denen der virale Partner während der sekundären Umhüllung in reife Viruspartikel inkorporiert wird (Loret *et al.*, 2008). Oben sind die Untereinheiten der ESCRT-Maschinerie in grau dargestellt und von links nach rechts nach ihren funktionalen Gruppierungen aufgereiht. Darunter befinden sich die Membranproteine (rot), Tegumentproteine (grün) sowie Capsidproteine (blau). Gestrichelte Linien stehen für unidirektionale Y2H-Interaktionen, solide Linien repräsentieren bidirektional oder mit zwei Proteinfragmenten identifizierte Interaktionen.

Durch eine solche grafische und sortierte Darstellung der Proteininteraktionen gewinnt man einen guten Überblick über die Datenlage. Die ESCRT-Proteine scheinen weniger mit den herpesviralen Membranproteinen zu interagieren, sondern vielmehr mit Komponenten der Tegumentschicht. Hier stechen besonders pUL47, pUL14 und pUL7 als hochverknüpfte Knotenpunkte hervor. Auch finden Wechselwirkungen zwischen den ESCRT- und Capsidproteinen statt. Auf funktionaler Ebene erscheinen besonders die Komplexe von ESCRT-I und -II involviert, die die Membranknospung induzieren, sowie solche Proteine, die den Abbau und somit das Recycling von ESCRT-III gewährleisten. Die DUBs gehen vor allem Wechselwirkungen mit Membranproteinen ein. Die Interpretation eines solchen Netzwerkes im physiologischen Kontext wird in der Diskussion besprochen (siehe 5.5).

#### 4.3.5 Kombination der intraviralen Proteininteraktionen mit dem Virus-Wirt-Netzwerk

Es ist nun ebenso möglich und auch von Interesse, mehrere PPI-Netzwerke miteinander zu kombinieren. Da in dieser Studie sowohl ein intravirales Netzwerk generiert und mit bereits vorhandenen Y2H-Daten erweitert wurde, aber auch ein Virus-Wirt-Interaktom zwischen zellulären ESCRT-Komponenten und HSV-1 Proteinen erstellt wurde, lassen sich diese Datensätze miteinander vereinigen. Dazu wurde ausschließlich auf die Y2H-Daten zurückgegriffen, die nur solche HSV-1 Proteine enthalten, die laut massenspektrometrischer Analyse im reifen Viruspartikel vorkommen (Loret *et al.*, 2008) (siehe 4.1.5 und 4.3.4). Die Interaktionsknoten sind dabei schematisch als knospendes Virus beim sekundären Umhüllungsschritt angeordnet (siehe Abbildung 4.19). Die vom Cytoplasma weggerichtete Vesikelknospe enthält die herpesviralen Membranproteine (rot) und umschließt dabei das tegumentierte (grün) Capsid (blau). Hier sind alle viralen Komponenten dargestellt, wie sie in reifen Viruspartikeln enthalten sind (Loret *et al.*, 2008), auch wenn für manche mittels *Y2H-Screening* kein Interaktionspartner identifiziert werden konnte. Auf der anderen Seite befinden sich die grau eingefärbten Untereinheiten der zellulären ESCRT-Maschinerie, die in der Reihenfolge ihrer Funktionalität angeordnet sind. Auch in diesem Netzwerk stehen gestrichelte Verbindungslinien für unidirektionale Y2H-Interaktionen und solide Linien für bidirektional oder mit mehreren Fragmenten identifizierte Interaktionen, die Linienstärke repräsentiert dabei die Häufigkeit (normal = zweifach, fett = dreifach).

Ein solches Modell erlaubt die Darstellung der Protein-Protein-Interaktionen, wie sie sich beim sekundären Umhüllungsschritt ereignen könnten. Die intraviralen Wechselwirkungen besonders zwischen den einzelnen Strukturkomponenten vermitteln dabei die Assemblierung des reifen Partikels. Die Umhüllung des viralen Capsids mit der Tegumentschicht wird sowohl durch Wechselwirkungen zwischen den beiden Strukturen als auch innerhalb des Teguments gewährleistet. Über Interaktionen mit den Membranproteinen an TGN- oder Endosomenvesikeln werden die tegumentierten Capside am Ort der sekundären Membranhüllung positioniert. Das Knospungsereignis wiederum könnte durch die Untereinheiten der zellulären ESCRT-Maschinerie induziert und durchgeführt werden. Neben der Rekrutierung dieser Faktoren durch ubiquitinierte Membranproteine scheint die direkte Interaktion mit Komponenten des reifen Partikels - sowohl Membranproteine als auch Tegument- oder Capsidproteine - wahrscheinlich. Anhand eines solchen Interaktoms lassen sich Rückschlüsse auf funktionale Abläufe während der sekundären Umhüllung ziehen, die für nachfolgende und tiefergehende Analysen erste Anhaltspunkte bieten.



## 5 DISKUSSION

### 5.1 Kritische Beurteilung des Hefe-2-Hybridsystems (Y2H) im Hochdurchsatzverfahren

Die Verwendung des Hefe-2-Hybridsystems (Y2H) zur Detektion von direkten Protein-Protein-Interaktionen (PPI) hat sich seit seiner Erfindung 1989 (Fields und Song, 1989) zum methodischen Standard etabliert. Es verfügt über einige Vorzüge, die es besonders zum Einsatz im Hochdurchsatzverfahren befähigen. Da der Nachweis der Interaktion in lebenden Hefezellen stattfindet, entfällt ein aufwendiges Aufreinigen des Proteinkomplexes. Auch ist die Durchführung des Protokolls einfach zu bewerkstelligen, und die Auswertung erfolgt in einem sehr kurzen Zeitrahmen. Darüber hinaus gilt das Y2H-System als äußerst sensitive Methode zur Untersuchung von PPI. Da es sich zur Verwendung mit Proteinen jeglicher Art und fast jeder Spezies eignet, findet es eine breite Anwendung (Fields, 2005).

Im Unterschied zur Identifikation von PPI durch die massenspektrometrische Analyse eines aufgereinigten Proteinkomplexes - z.B. mittels *tandem affinity purification* (TAP) - werden durch den Gebrauch des Y2H-Systems vorwiegend binäre Interaktionen detektiert. Dies bietet den Vorteil, dass vor allem direkte PPI zwischen zwei Interaktionspartnern identifiziert werden. Dadurch entsteht die Möglichkeit, insbesondere schwache oder transiente Interaktionen zu dokumentieren. Allerdings besteht hier die Gefahr, auch solche PPI durch Y2H zu ermitteln, die im physiologischen Kontext der Zelle entweder räumlich oder zeitlich nicht stattfinden können (falsch-positive). Ferner können indirekte Interaktionen, wie z.B. in einem Proteinkomplex, nicht nachgewiesen werden. Allerdings erlaubt ein großer Datensatz, wie er durch die Anwendung des Y2H im Hochdurchsatz und oft zur Identifizierung proteomweiter PPI eines Organismus generiert wird, durch bioinformatische Analysen den Rückschluss auf Komplex- oder Modulbildung einer Gruppe von Proteinen. Eine solche genomweite PPI-Studie stellt einen Ausgangspunkt dar, die Daten mit anderen Studien zu vergleichen oder gar zu verbinden, und bildet somit eine solide Grundlage für nachfolgende Untersuchungen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Matrix-basierten Y2H-Screens besitzen einige Vorteile gegenüber den sogenannten *Library*-basierten Screens. Bei letzteren wird ein *bait*-Fusionsprotein gegen einen ganzen Pool von cDNA-Sequenzen getestet. Die Verwendung von cDNA eines bestimmten Zelltyps begünstigt dabei die Detektion von PPI mit konstitutiv exprimierten Proteinen gegenüber wenig abundanten Proteinen. Außerdem entfällt durch die Anordnung der zu untersuchenden potenziellen Partner in einer definierten Matrix die Identifizierung der Interaktionspartner durch Sequenzierung

der positiven Paare. Darüber hinaus können mittels Matrix-basierten Y2H-Screens Proteinkombinationen gezielt auf Interaktion getestet werden, während die Proteinidentitäten einer cDNA-Library auf Grund ihrer Komplexität größtenteils unbekannt sind.

Gleichwohl ist das Hefe-2-Hybridsystem im Hochdurchsatz anfällig für die Erzeugung von sowohl falsch-positiven als auch falsch-negativen Daten. Bei den falsch-positiven PPI handelt es sich, wie schon erwähnt, in der Regel um Interaktionen zwischen Proteinen, die zwar bei Koexpression im Hefenuklear interagieren, aber in der zellulären Umgebung niemals im gleichen Kompartiment oder in der selben Expressionsphase anzutreffen sind. Auch können falsch-positive Interaktionen durch die Autoaktivierung des Reportergens durch einen der beiden Partner allein vorgetäuscht werden. Diese Art der falsch-positiven Interaktionen lassen sich allerdings durch drei verschiedene Kontrollansätze - wie in dieser Studie geschehen - verhindern bzw. möglichst reduzieren. Da sowohl *bait*- und *prey*-Proteine immer in Kombination mit dem entsprechenden Leervektor auf Induktion des Reportersystems getestet wurden, konnten autoaktivierende Fusionsproteine im Vorhinein von der Auswertung ausgeschlossen werden. Auch der Einsatz von steigenden Konzentrationen des *HIS3*-Reportergen-Inhibitors 3-AT, der einerseits die Unterscheidung von schwachen und starken PPI erlaubt, sorgt andererseits für die Unterdrückung von autoaktivierenden Fusionsproteinen. Zur weiteren Kontrolle von Autoaktivität wurde der jeweilige *bait*- bzw. *prey-count* ermittelt. Dieser Wert besagt, wie oft ein bestimmtes Fusionsprotein im Rahmen aller Screens als positiver Interaktor gefunden wurde. Diese Kontrolle wird oft in sehr umfangreichen Y2H-Screens und anstelle der Kombination mit dem Leervektor verwendet. Daher wird üblicherweise hier ein sehr geringer Prozentsatz als Schwellenwert gewählt (Bartel *et al.*, 1996). Da in dieser Studie schon vor der Auswertung alle autoaktivierenden Fusionsproteine sorgfältig aussortiert und insgesamt vergleichsweise wenig Kandidaten eingesetzt wurden, gilt hier ein Wert bis 50% als akzeptabel, der allerdings auch nie überschritten wurde.

Ebenso wie falsch-positive PPI mittels Y2H-System generiert werden können, so gibt es auch einen gewissen Prozentsatz an falsch-negativen PPI in einem groß angelegten Screen. Ursache dafür sind größtenteils sterische Behinderungen oder Konformationsänderungen der Fusionsproteine durch die angefügten Y2H-tags, die die Interaktion zwischen zwei Proteinen stören können. Auch ist es möglich, dass schwache Interaktionen nicht detektiert werden, die im zellulären Rahmen durch weitere Komplexpartner stabilisiert werden (Titz *et al.*, 2004). Des Weiteren können einige posttranslationale Modifikationen von Proteinen der höheren Eukaryoten insbesondere nicht im Nuklear der Hefezelle gewährleistet werden, so dass Wechselwirkungen, die über diese Proteinmodifikationen vermittelt oder unterstützt werden, im Y2H-System nicht detektiert werden. Außerdem kann es vorkommen, dass einzelne Fusionsproteine für die Hefezelle toxisch wirken und

somit keine Interaktionen dieser Proteine in den lebenden Hefezellen identifiziert werden können. Besonders die Zahl der falsch-negativen PPI auf Grund sterischer oder konformationeller Behinderung könnte sich durch die Verwendung weiterer Hefevektoren vermindern lassen, bei denen die Expression des Fusionsproteins zusätzlich mit C-terminalem *tag* erfolgt. Durch die sich daraus ergebenden vielfältigeren Testkombinationen von N- und C-terminalen Y2H-*tags* können vor allem räumliche Einschränkungen der PPI umgangen werden (Stellberger *et al.*, 2010). Aus dem Vergleich mehrerer großer Y2H-Datensätze, die in verschiedenen Labors angefertigt wurden, lässt sich schließen, dass mit Hochdurchsatz-Ansätzen eher mehr falsch-negative als falsch-positive Daten produziert werden, was im Endergebnis die Faktenlage weniger stark verfälscht als umgekehrt (Yu *et al.*, 2008).

Wird das Hefe-2-Hybridsystem im Hochdurchsatzverfahren angewendet, entfallen häufig nachfolgende Validierungsexperimente und funktionelle Charakterisierungen der betreffenden Interaktionen, wie sie üblicherweise bei der Erforschung von PPI im kleinen Maßstab durchgeführt werden. Allerdings wurde gezeigt, dass mit einem einzigen Y2H-Durchlauf bis zu 60% aller möglichen Interaktionen identifiziert werden können, bei Wiederholungen erhöht sich dieser Wert auf 80 - 90% (Yu *et al.*, 2008). In der gleichen Studie wurde belegt, dass durch die Verwendung alternativer Methoden das Spektrum der Y2H-Interaktionen eher erweitert als validiert wird, da durch unterschiedliche experimentelle Ansätze auch unterschiedliche Ergebnisse produziert werden. Trotz einer gewissen systembehafteten Limitierung stellt das Y2H-System besonders zur Identifizierung von PPI im Hochdurchsatzverfahren bei sorgfältiger Durchführung und Auswertung ein ausgezeichnetes Werkzeug dar.

### **5.1.1 Die Verwendung von Membranproteinen im Y2H-System**

Das Hefe-2-Hybridsystem (Y2H) eignet sich nur bedingt dazu, Protein-Protein-Interaktionen von Membranproteinen zu detektieren, da ihre Membran-durchquerenden hydrophoben Domänen sowie ihre hydrophoben Signalpeptidsequenzen mit dem Y2H-System interferieren können. Einerseits kann die Präsenz von hydrophoben Bereichen zur Fehlfaltung des entsprechenden Membranproteins in wässriger Umgebung führen, andererseits können sie den Zugang der betreffenden Fusionsproteine zum Hefenuklear verhindern. Um diese Hürde zu umgehen, bietet sich der Einsatz von Proteinfragmenten an, die extramembranäre Bereiche der Membranproteine repräsentieren. Der große Vorteil bei dieser Herangehensweise ist, dass auf diese Art mehr PPI der Membranproteine identifiziert werden können als bei reiner Verwendung der Volle-Länge-Proteine. Allerdings birgt die Verwendung von Proteinfragmenten auch die Gefahr, dass Interaktionen auf Grund fehlender Domänen, die die Wechselwirkung vermitteln oder kooperativ unterstützen, nicht

detektiert werden. Bei Membranproteinen kommt hinzu, dass die verwendeten Proteinfragmente auf unterschiedlichen Seiten der Membran lokalisieren und somit in luminal/extrazelluläre und cytoplasmatische Fragmente differenziert werden. Somit kann eine Wechselwirkung nur zwischen den jeweiligen cytoplasmatischen bzw. luminalen Fragmenten nachgewiesen werden. Darüberhinaus kann eine Glykosylierung der luminalen Fragmente, die normalerweise im endoplasmatischen Retikulum (ER) und Golgi-Apparat stattfindet, im nukleoplasmatischen Hefe-2-Hybridssystem nicht gewährleistet werden. Daher ist es möglich, einige PPI nicht zu detektieren, bei deren Wechselwirkung die entsprechenden Kohlenhydratgruppen beteiligt oder sogar maßgeblich sind.

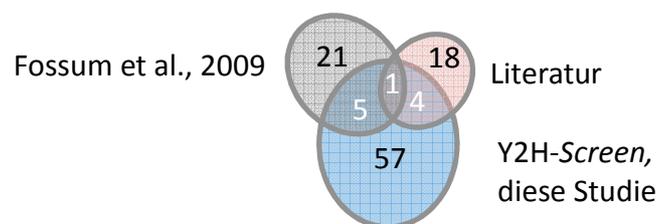
Um intravirale PPI der HSV-1 Membranproteine zu detektieren, wurde das Y2H-System in einem systematischen Hochdurchsatzverfahren angewandt. Trotz des Anspruchs auf möglichst hohe Vollständigkeit war es teilweise nicht möglich, von einem Typ-I oder -II Membranprotein beide extramembranären Fragmente zu verwenden, da eines oft wegen zu geringer Größe nicht kloniert werden konnte. Aus dem selben Grund war es bei Typ-III Membranproteinen erschwert, alle extramembranären Fragmente einzusetzen. Ausserdem beruht ihre voraussichtliche Topologie zumeist auf algorithmischen Vorhersagen, so dass keine experimentelle Klarheit über die genaue Verteilung ihrer Membrandomänen besteht. Insgesamt konnten allerdings mit dieser Methode viele neue Y2H-PPI der herpesviralen Membranproteine generiert werden, die zur Erweiterung und Verfeinerung des bestehenden intraviralen HSV-1 Interaktoms beitragen konnten.

Auf Grund der hydrophoben Domänen von HSV-1 Membranproteinen können ihre Y2H-Interaktionsdaten nur mit wenigen alternativen PPI-Methoden validiert werden. Ein experimenteller Ansatz zur Verifikation sollte auf Grund der großen Zahl an PPI auch zur Verwendung im Hochdurchsatzverfahren geeignet sein. Eine sehr elegante Lösung stellt die Verwendung des BRET-Assays dar, bei der die PPI von Membranproteinen *in situ*, also unter Berücksichtigung ihrer subzellulären Lokalisierung sowie ihrer Topologie getestet werden. Die Eignung dieser Methode soll unter Punkt 5.3 besprochen werden. Ähnlich gut geeignet wäre eine modifizierte Variante des Hefe-2-Hybridsystems, das Split-Ubiquitin System (Stagljar *et al.*, 1998), welches besonders für den Nachweis von cytoplasmatischen PPI der Membranproteine tauglich ist (Fields, 2005). Es beruht auf der Koexpression von Membranproteinen in Hefezellen, die jeweils die N- und C-terminale Domäne von Ubiquitin (Ub) anfusioniert tragen. Darüber hinaus wird ein Transkriptionsfaktor in Fusion zur C-terminalen Domäne von Ub exprimiert. Durch Interaktion der beiden Membranproteine wird das Ub rekonstituiert und proteolytisch gespalten, was zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors führt, welcher die Reporteraktivität induziert. Allerdings müssten hier die entsprechenden Vektoren

zunächst noch so modifiziert werden, dass sie Gateway-kompatibel genutzt werden könnten, gefolgt von der Etablierung des Systems in Flüssigmedien.

## 5.2 Intravirale Interaktionen der HSV-1 Membranproteine

Auf Grund vielfältiger funktionaler und vergleichender Studien ist bekannt, dass den Membranproteinen des Herpes Simplex-Virus 1 sowohl als strukturelle Komponente reifer Viruspartikel als auch während der Virion-Morphogenese eine große Bedeutung zukommt. Trotzdem sind bis heute nur 18 intravirale Protein-Protein-Interaktionen (PPI) bekannt, an denen mindestens ein Membranprotein beteiligt ist (Johnson *et al.*, 1988; Roop *et al.*, 1993; Reynolds *et al.*, 2001; Chi *et al.*, 2005; Perez-Romero *et al.*, 2005; Atanasiu *et al.*, 2007; Avitabile *et al.*, 2007; Farnsworth *et al.*, 2007; Foster *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2008; Stylianou *et al.*, 2009; Wills *et al.*, 2009; Chouljenko *et al.*, 2010). Zwar ist es vor einiger Zeit gelungen, mittels genomweitem Y2H-Screening im Hochdurchsatz die Zahl potenzieller PPI der Membranproteine unter Verwendung von zumeist Volle-Länge-Proteinen um erneut 20 zu erhöhen (Fossum *et al.*, 2009; Schmidt, 2009), allerdings würde man auf Grund ihrer kritischen Funktionen während des Replikationszyklus eine weitaus höhere Zahl an intraviralen PPI erwarten. Über ein möglichst komplettes Spektrum der intraviralen PPI der herpesviralen Membranproteine können Rückschlüsse auf funktionelle Zusammenhänge gezogen werden, darüber hinaus dient ein solcher Datensatz als Ausgangspunkt für weitergehende Studien der z.T. noch unaufgeklärten Aufgaben der Membranproteine im Lebenszyklus des HSV-1.



**Abbildung 5.1: Schnittmenge der PPI von HSV-1 Membranproteinen**

Die gemeinsame Schnittmenge der Protein-Protein-Interaktionen (PPI) von HSV-1, bei dem mindestens ein Partner ein Membranprotein ist, ist als Mengendiagramm dargestellt. Der blaue Kreis repräsentiert die 57 PPI, die mittels Matrix-basiertem Y2H in dieser Studie identifiziert wurden. Der graue Kreis steht für die 21 PPI, die in einem vorangegangenen Y2H-Screening gefunden wurden (Fossum *et al.*, 2009; Schmidt, 2009) und der rosa Kreis zeigt die durch Literaturrecherche ermittelten 18 Interaktionen (Johnson *et al.*, 1988; Roop *et al.*, 1993; Reynolds *et al.*, 2001; Chi *et al.*, 2005; Perez-Romero *et al.*, 2005; Atanasiu *et al.*, 2007; Avitabile *et al.*, 2007; Farnsworth *et al.*, 2007; Foster *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2008; Stylianou *et al.*, 2009; Wills *et al.*, 2009; Chouljenko *et al.*, 2010). Die Zahl in den überlappenden Bereichen gibt die gemeinsame Schnittmenge an PPI an.

Da die Volle-Länge-Proteine wegen ihrer hydrophoben Transmembrandomänen weniger gut für das Y2H-System geeignet sind, sollten in dieser Studie bevorzugt extramembranäre Fragmente für das Matrix-basierte Y2H-Screening eingesetzt werden. Dabei wurde besonders auf den Ausschluss der

ebenfalls hydrophoben ER-Insertionssignalsequenzen geachtet. Durch die Verwendung von 18 extramembranären Proteinfragmenten im Y2H-*Screening* konnten insgesamt 57 intravirale Protein-Protein-Interaktionen identifiziert werden. Darunter befinden sich 17 der 19 potenziellen Membranproteine des HSV-1 als Interaktionspartner (siehe Abbildung 4.2). Davon sind 48 PPI – also ca. 84% - als neu zu betrachten, während die restlichen 16% durch den vorangegangenen Y2H-*Screen* bzw. andere Studien bereits bekannt waren. Allerdings konnten 14 der durch die Literatur geläufigen PPI und 16 PPI aus dem Datensatz von Fossum *et al.*, 2009 nicht detektiert werden (siehe Abbildung 5.1). Ein relativ geringer Wiederfindungswert ist ein übliches Phänomen von genomweiten PPI-Untersuchungen im Hochdurchsatzverfahren (Gavin *et al.*, 2002; Ho *et al.*, 2002; Rual *et al.*, 2005), die Rate liegt durchschnittlich maximal bei 10% und ist unabhängig von der verwendeten Methode. Speziell im Vergleich zum vorangegangenen Y2H-*Screen* resultieren die voneinander abweichenden Daten aus der Verwendung unterschiedlicher Fusionsproteine. Da bei Fossum *et al.*, 2009 größtenteils Volle-Länge-Membranproteine und zum Teil andere Proteinfragmente für das Y2H-*Screening* eingesetzt wurden als in dieser Studie, kann die gemeinsame Schnittmenge maximal lediglich 8 Paare beinhalten, von denen 5 erneut detektiert wurden. Trotzdem ist eine Wiederfindungsrate von 5 aus insgesamt 21 Interaktionspaaren (also knapp 25%), bei denen mindestens ein Partner ein Membranprotein ist, ungewöhnlich hoch. Das gleiche gilt für die Schnittmenge mit anderen in der Literatur veröffentlichten PPI-Paaren. Rein rechnerisch ergibt sich hier eine Überschneidung von ca. 22% (4 aus 18 Paaren), die ebenfalls sehr hoch ist. Bei einem Teil der nicht-identifizierten PPI wurde die entsprechende interagierende Domäne nicht für das Y2H-*Screening* eingesetzt. Als Beispiel wäre hier die PPI von pUL20 und gK (UL53) zu nennen (Foster *et al.*, 2008), die über die N-terminale Domäne von pUL20 und die Domäne III von gK vermittelt wird. Zwar wurde die richtige Domäne von pUL20 benutzt (UL20A), allerdings nicht die adäquate Domäne von gK, sondern nur dessen luminal exponierter N-Terminus ohne Signalpeptid (UL53A). Bei den restlichen nicht-gefundenen, aber aus der Literatur bekannten PPI, handelt es sich wahrscheinlich um falsch-negative Befunde dieser Y2H-Studie. Wie zuvor schon erwähnt, haben falsch-negative Ergebnisse ihren Ursprung häufig in der sterischen oder konformationellen Behinderung der Interaktion durch das Anfusionieren der *bait*- und *prey*-Domänen. Darüber hinaus können Interaktionen innerhalb eines Komplexes oder solche, die zur Stabilisierung einen dritten Partner benötigen, mittels Y2H kaum detektiert werden. Die erstaunlich gute Wiederfindungsrate gilt allerdings als Indiz, dass der Anteil an falsch-negativen Befunden relativ gering ausfällt. Auch die Quote der falsch-positiven Ergebnisse wurde durch sorgfältige Auswertung und Verwendung intrinsischer Kontrollen möglichst niedrig gehalten. So wurden alle autoaktivierenden Fusionsproteine entweder direkt von der Auswertung ausgeschlossen oder ihre Selbstaktivität durch

Verwendung von hohen Konzentration des *HIS3*-Inhibitors 3-AT unterdrückt. Außerdem wurden die offensichtlich falsch-positiven Resultate - also solche Interaktionen, die auf Grund gegensätzlicher Orientierung an der Membran physiologisch unmöglich sind - ebenfalls im Vorhinein aussortiert. Lediglich der relativ geringe Prozentsatz (ca. 15%) an bidirektional detektierten PPI – 3 Selbstinteraktionen und 6 Paare – ist verwunderlich. Theoretisch sollte man davon ausgehen, dass eine Protein-Protein-Interaktion im Y2H-System jeweils in beide Richtungen funktionieren sollte, unabhängig von der Expression als *bait*- oder *prey*-Fusionsprotein. Dies ist jedoch praktisch nicht der Fall. Auch hier sind es wohl sterische Gründe, die eine Interaktion behindern, die bei umgekehrter Kombination der Fusions-*tags* ein positives Signal ergibt. Wie in den meisten groß-angelegten Y2H-Analysen wird nur ein relativ kleiner Teil an PPI bidirektional identifiziert (Uetz *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2008; Fossum *et al.*, 2009). Obwohl davon ausgegangen werden muss, dass auch dieser neue Y2H-Datensatz der PPI der HSV-1 Membranproteine nicht alle tatsächlich vorkommenden intraviralen Wechselwirkungen aufdeckt, konnten doch sehr viele neue Interaktionspartner von Membranproteinen identifiziert werden. Der Vergleich mit der Literatur sowie die hohe Sorgfalt bei Durchführung und Auswertung der Y2H-Screens weisen auf eine hohe Qualität der Studie mit sowohl wenig falsch-positiven als auch falsch-negativen Ergebnissen hin. Insgesamt bietet diese Analyse eine solide Grundlage für nachfolgende Validierungsexperimente und funktionelle Charakterisierungen einzelner Proteinpaare.

Um eine solch große Datenmenge zusammenfassend und überschaubar darzustellen, bedient man sich bioinformatischer Methoden, wie z.B. der Veranschaulichung mit Hilfe eines Netzwerkes. Auf diese Art werden großformatige PPI-Daten als Interaktionsnetzwerk herausgearbeitet, dessen topologische Eigenschaften zur Charakterisierung herangezogen werden können. Obwohl sich die Herpesviren parallel und in Abhängigkeit ihres Wirtes evolviert haben, besitzen ihre PPI-Netzwerke eine abweichende Topologie zu zellulären Pendanten. So weist auch das in dieser Studie erarbeitete Netzwerk der HSV-1 Membranproteine divergierende Eigenschaften auf. Ebenso wie die genomweiten PPI-Analysen verschiedener Herpesviruspezies (Uetz *et al.*, 2006; Fossum *et al.*, 2009) verfügt auch dieses intravirale Netzwerk über weniger periphere Knotenpunkte, die jeweils nur mit einem einzigen Nachbarn verknüpft sind, und mehr hochverknüpfte *hubs* als typische zelluläre Interaktome und ist somit nicht als *scale-free* zu bezeichnen. Auch gibt es keine Unterteilung in Submodule, wie es typisch für zelluläre Netzwerke ist, sondern das virale Interaktom erscheint als ein einziges Modul. In Anbetracht der Tatsache, dass es sich bei Viren um Wirts-abhängige „Lebensformen“ handelt, die sich nicht selbständig reproduzieren und über keinen eigenen Stoffwechsel verfügen, erscheint diese andersartige Netzwerktopologie als zwangsläufig.

Selbstverständlich fehlen in einem rein viralen Interaktom sehr viele essenzielle Knotenpunkte, die erst von der Wirtszelle geliefert werden. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass sich die Netzwerktopologie von viralen Interaktomen noch verändert, wenn sie mit zellulären PPI-Daten zu einem großen Netzwerk kombiniert werden (Uetz *et al.*, 2006). Das zuvor stark vernetzte und nicht unterteilte virale Modul von KSHV und VZV wandelte sich durch die Verknüpfung mit PPI-Daten seiner zellulären Interaktionspartner zu einem typisch skalenfreien Netzwerk mit Aufteilung in mehrere Submodule. Diese Eigenschaft kann dem hier präsentierten Netzwerk der HSV-1 Membranproteine ebenfalls unterstellt werden. Insgesamt zeigt sich also durch die Charakterisierung und den Vergleich von Netzwerkmerkmalen die Abhängigkeit des Virus von seiner Wirtszelle.

Neben einer solchen eher abstrakten bioinformatischen Auswertung des intraviralen PPI-Datensatzes der HSV-1 Membranproteine ist natürlich die inhaltliche Interpretation von einzelnen PPI oder größeren Zusammenhängen von besonderem Interesse. Zunächst lässt sich durch den Vergleich mit der Fachliteratur eine Aussage darüber treffen, welche PPI als besonders wahrscheinlich gelten. So konnte mittels Y2H die Interaktion der luminalen Fragmente von gL (UL1) und gD (US6) identifiziert werden, die zuvor bereits vermutet wurde (Perez-Romero *et al.*, 2005). Da gL im Komplex mit gH (UL22) vorliegt, und gH wiederum mit gD während des Virus *entry* interagiert, liegt es nahe, dass auch gL an dieser Interaktion beteiligt ist. Ebenso wurde in dieser Studie gezeigt, dass die C-terminale Domäne von gM (UL10) mit beiden Proteinen des *nuclear egress complex* (NEC) – pUL34 und pUL31 – in Interaktion tritt. Diese Wechselwirkungen stehen in Einklang mit dem Befund, dass die Proteine des NEC für die optimale Lokalisierung von gM an der inneren Kernmembran (INM) während der Infektion benötigt werden (Wills *et al.*, 2009). Auf diese Art lassen sich auf Grund funktionaler Befunde vorgeschlagene Interaktionen, die bisher nicht experimentell bewiesen wurden, mit den Ergebnissen aus dieser Y2H-Studie bestätigen.

Darüber hinaus lassen sich durch die Darstellung der Y2H-Daten als Interaktionsnetzwerk besonders gut die hochverknüpften *hubs* identifizieren (siehe Abbildung 4.2), die von zentraler Bedeutung für die Virusreplikation sein sollten. Hier fällt besonders pUL34 auf, das zusammen mit seinem Interaktionspartner pUL31 essenziell für die Auswanderung der neu gebildeten Capside aus dem Nukleus infizierter Zellen ist (Reynolds *et al.*, 2001). Neben dieser bereits bekannten Interaktion konnten als neue potenzielle Interaktionskandidaten hauptsächlich Proteine der Tegumentschicht und der Capsidhülle identifiziert werden. In Übereinstimmung mit der Beteiligung von pUL34 am primären Knospungsereignis an der Kernhülle ist es denkbar, dass es als Kernmembranprotein über Wechselwirkungen mit dem Capsid bzw. seiner primären Tegumentschicht die neu gebildeten Capside zur INM rekrutiert und als Brücke zwischen Kernmembran und Capsid dient.

Auch das Typ-III Membranprotein gM (UL10) stellt laut dieser Y2H-Analyse einen zentralen Knotenpunkt dar, obwohl es zumindest für HSV-1 keine essenzielle Funktion besitzt. Auch hier sind die Interaktionspartner vor allem Tegument- und Capsidproteine, aber auch andere Membranproteine sowie nukleär lokalisierte Nicht-Strukturproteine. Auf Grund der Lokalisierung von gM während der Infektion sowohl an den Kernmembranen, am *trans*-Golgi Netzwerk (TGN) und an der Plasmamembran (Baines und Roizman, 1993; Crump *et al.*, 2004; Wills *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009) und Analysen von Deletionsmutanten (Browne *et al.*, 2004) gilt eine Beteiligung von gM an beiden viralen Umhüllungsschritten – an der INM und an TGN-Membranen – als wahrscheinlich. Diese mögliche Doppelfunktion von gM an zwei verschiedenen Zellkompartimenten spiegelt sich auch in den Y2H-Interaktionsdaten dieser Studie wieder. Die zuvor erwähnte Interaktion mit dem *nuclear egress complex*, aber auch mit Capsidkomponenten (pUL38, pUL33, pUL28, pUL26) sowie nukleär lokalisierten Nicht-Strukturproteinen (pUL54, pUL52, pUL40) sind mit der theoretischen Aufgabe von gM am primären Umhüllungsschritt an der INM vereinbar. Von den Proteinen des NEC zur inneren Kernhülle rekrutiert (Wills *et al.*, 2009) könnte es dort ebenfalls der Verbindung von knospendem Capsid und der INM dienen. Da gM regulatorische Eigenschaften bei der Membranfusion zugesprochen werden (Klupp *et al.*, 2000; Koyano *et al.*, 2003; Crump *et al.*, 2004), scheint auch eine Beteiligung am *de-envelopment*-Prozess durch Membranfusion an der äußeren Kernmembran möglich.

Andererseits unterstützen die mittels Y2H identifizierte Wechselwirkungen von gM mit Tegumentkomponenten (pUL14, pUL7, pUS10, pUS2) und anderen viralen Membranproteinen (pUL20, pUL56), die ebenfalls in reife Viruspartikel inkorporiert werden (Loret *et al.*, 2008), eine Funktion von gM während der sekundären Umhüllung. Die Interaktion mit der herpesviralen Tegumentschicht könnte dabei ebenfalls der Rekrutierung und Anbindung tegumentierter Capside an TGN-Membranen dienen. Auch eine Interaktion von gM mit pUL20 ist zumindest auf funktionaler Ebene nicht ausgeschlossen, da es auch an der sekundären Umhüllung beteiligt ist und eine Rolle bei der Zell-Zellfusion infizierter Wirtszellen spielt (Melancon *et al.*, 2007; Foster *et al.*, 2008; Chouljenko *et al.*, 2010). Insbesondere die Interaktion von gM mit dem Typ-II Membranprotein pUL56 erscheint besonders interessant, da sie sowohl bidirektional mit dem cytoplasmatischen Fragment von pUL56 als auch mit dem Volle-Länge-Protein detektiert wurde. Bei pUL56 von HSV-1 handelt es sich um ein Membranprotein von unbekannter Funktion. Allerdings lokalisiert das orthologe Protein des Herpes simplex-Virus 2 (HSV-2) am Golgi-Apparat, am TGN sowie den frühen Endosomen und eine Beteiligung am viralen *egress* wird vorgeschlagen (Ushijima *et al.*, 2009). Es empfiehlt sich, eine mögliche Kolokalisierung von gM und pUL56 sowohl nach transientscher Expression als auch im viralen Kontext zu untersuchen und die denkbare funktionale Kooperation der beiden Membranproteine

während der sekundären Umhüllung der Viruspartikel zu analysieren. Anhand dieser beispielhaften Überlegungen und der Einbindung des intraviralen Y2H-Datensatzes in aktuelle Forschungsergebnisse zeigt sich das Potenzial der genomweiten PPI-Analyse des HSV-1, indem interessante Kandidatenpaare für nachfolgende Studien ausgewählt werden können.

Für ein besseres Verständnis der Zusammenhänge innerhalb des HSV-1 Proteoms ist es hilfreich, den in dieser Studie generierten Y2H-Datensatz in andere Analysen einzubinden, um je nach Fragestellung eine übersichtliche Datenlage zu erhalten. So ist es naheliegend, die neu identifizierten PPI der HSV-1 Membranproteine mit dem genomweiten intraviralen Interaktom einer anderen Studie zu kombinieren (Fossum *et al.*, 2009; Schmidt, 2009), um ein möglichst umfassendes Bild der intraviralen HSV-1 PPI zu erhalten (siehe Abbildung 4.6). Durch die Zusammenlegung der beiden Y2H-Studien konnte das Interaktom von HSV-1 einerseits noch weiter vervollständigt werden und andererseits dient die Wiederfindung einzelner PPI durch unabhängige Y2H-Analysen als Validierung der jeweiligen Interaktion. Auch dieses Netzwerk kann zur übersichtlichen Darstellung aller identifizierten intraviralen PPI genutzt werden und Hinweise auf zentrale Knotenpunkte oder interessante Verknüpfungen liefern, die in nachfolgenden Studien weiter untersucht werden sollten. Auch die Kombination der intraviralen PPI mit einer massenspektrometrischen Analyse reifer Viruspartikel (Loret *et al.*, 2008) zeigt die Wechselwirkungen sowohl zwischen als auch innerhalb der drei Virusstrukturen Capsid, Tegument und Membran, wie sie sich im physiologischen Kontext abspielen können (siehe Abbildung 4.7). Da besonders die vielfältigen Interaktionen der einzelnen Strukturproteine als treibende Kraft der Tegumentierung und sekundären Umhüllung im Cytoplasma der Wirtszelle größtenteils noch unaufgeklärt sind, bietet diese Verbindung aus drei verschiedenen Datensätzen ein erstes ausführliches Modell. Alle 13 im reifen Partikel enthaltenen Membranproteine zeigen Wechselwirkungen untereinander, aber auch mit den Komponenten der Tegumentschicht. Allerdings konnten für insgesamt zehn Proteine des Teguments bzw. fünf Capsidproteine gar keine PPI identifiziert werden, was vermutlich aus den bereits diskutierten Limitierungen des Y2H-Systems hervorgeht. Da davon auszugehen ist, dass alle Strukturproteine durch Wechselwirkungen miteinander konzentriert und in reife Partikel inkorporiert werden, scheinen einige physiologisch relevante PPI nicht detektiert worden zu sein. Dennoch bietet diese schematische Darstellung einen ersten Überblick und eine gute Basis für weitergehende Analysen. Besonders aus der systembiologischen Sichtweise wäre es interessant, die Konservierung der PPI der Membranproteine der humanpathogenen Herpesviren sowohl innerhalb der Unterfamilie ( $\alpha$ -Herpesviren) als auch im Vergleich zu den restlichen Spezies zu überprüfen. Da HSV-1 vor allem mit VZV, dem Erreger von Windpocken und Gürtelrose, auf Grund ihrer Zugehörigkeit zur Familie der  $\alpha$ -

Herpesviren viele orthologe Membranproteine teilt, wäre die Identifizierung von gemeinsamen PPI-Mustern sehr hilfreich. Auf diese Art könnten typische Abläufe und Zusammenhänge innerhalb dieser Unterfamilie aufgezeigt werden. Auch die Aufdeckung von konservierten Interaktionen der sogenannten *Core-Orthologen* - der in allen Spezies konservierten herpesviralen Proteine - wäre von großem Erkenntnisgewinn. Da zu den *Core-Orthologen* nur sechs Membranproteine zählen, würde es sich hierbei auch um einen recht übersichtlichen Datensatz handeln. Weil die Tatsache der evolutionären Konservierung auf die Beteiligung an wichtigen oder sogar essenziellen Prozessen der Virusreplikation schließen lässt, könnten so konservierte Wechselwirkungen ermittelt werden. Solche konservierten PPI wiederum würden auf gemeinsame Mechanismen der Virusreplikation deuten, wie z.B. bei der konzertierten Aktion mehrerer Glykoproteine während des Virus *entry* (Connolly *et al.*, 2011).

Die Infektion mit Herpesviren bzw. ihre Reaktivierung aus der Latenzphase ist besonders problematisch für immunsupprimierte Patienten, wie Empfänger von Organspenden oder AIDS-Patienten. Daher ist letztendlich das übergeordnete Ziel der Herpesvirusforschung ebenso wie auch dieser Studie, Angriffspunkte zur Entwicklung antiviraler Therapien zu finden und auszunutzen. Optimal wäre dabei die Intervention auf viraler Ebene, ohne zelluläre Prozesse zu stören. Deshalb ist es von besonderem Interesse, alle Wechselwirkungen des viralen Proteoms sowohl auf intraviraler Ebene, aber auch auf Virus-Wirts-Ebene zu identifizieren. Durch ein möglichst umfassendes Netzwerk lassen sich so Kandidatenproteine ausmachen, die auf Grund ihrer vielen Interaktionen und funktionaler Charakterisierung eine zentrale Rolle während der HSV-1 Replikation einnehmen. Durch den Vergleich mit den Netzwerken anderer Spezies lassen sich möglicherweise sogar konservierte PPI identifizieren, so dass eine gemeinsame Strategie gegen mehrere Spezies entwickelt werden könnte. Grundsätzlich gibt es zwei Konzepte, wie eine essenzielle Protein-Protein-Interaktion als Angriffspunkt zu therapeutischen Zwecken genutzt werden kann. So könnte die Expression eines oder sogar beider Partner auf post-transkriptionaler Ebene mittels RNA-Interferenz (RNAi) spezifisch unterdrückt werden. Dieser Therapieansatz wird derzeit besonders für die Behandlung von Krebs und neurodegenerativen Erkrankungen erforscht (Boudreau und Davidson, 2010; Okamoto und Murawaki, 2011), scheint aber ebenso vielversprechend für die Entwicklung von Virostatika zu sein. Die zweite antivirale Strategie strebt die Disruption von Protein-Protein-Interaktionen durch Verwendung von Antikörpern, Peptiden oder kleinen chemischen Molekülen an (Loregian und Palu, 2005; Mercorelli *et al.*, 2011).

### 5.3 Das BRET-System als Validierungsmöglichkeit von Y2H-Daten

Das BRET-System (*bioluminescence resonance energy transfer*) ist eine fluoreszenz-basierte Methode, um Protein-Protein-Interaktionen (PPI) zu untersuchen (Bacart *et al.*, 2008). Dieses System stellt eine Weiterentwicklung der FRET-Technik dar (*Förster resonance energy transfer*) und basiert auf der Energieübertragung von einer Donor- auf eine Akzeptoreinheit in großer räumlicher Nähe (Boute *et al.*, 2002; Ciruela, 2008). Im Vergleich zum Hefe-2-Hybridsystem (Y2H) bietet es zwar einige Vorteile, verfügt aber auch über nachteilige Eigenschaften. Die größte Stärke des BRET-Systems ist, dass die PPI in lebenden Säugerzellen überprüft werden können. Für die viralen Proteine von HSV-1 bedeutet dies, dass ihre Expression sowie die Untersuchung ihrer Wechselwirkungen *in situ* stattfinden. So werden alle posttranslationalen Modifikationen der höheren Eukaryoten gewährleistet, die eine Interaktion beeinflussen könnten. Außerdem werden die PPI auf subzellulärer Ebene getestet, so dass nur solche Interaktionen nachgewiesen werden können, bei denen beide Partner im physiologischen Kontext im selben Kompartiment lokalisieren.

Ebenso wie bei anderen PPI-Methoden, bei denen relativ große *tags* zum Einsatz kommen, birgt auch das BRET-System die Gefahr, dass die Interaktion sterisch oder konformationell behindert wird und daher nicht detektiert werden kann (falsch-negative). Darüber hinaus ist es möglich, dass der Transport von Membranproteinen in den Nukleus durch das Anhängen eines großen *tags* auf der nukleo- bzw. cytoplasmatisch exponierten Seite behindert wird und nukleoplasmatische PPI nicht stattfinden können. Werden HSV-1 Proteine für das BRET-System benutzt, so können Interaktionen zwar im physiologischen Kontext der Wirtszelle nachgewiesen werden, allerdings nur im Virus-freien System. So kann die Detektion einer HSV-1 PPI im BRET-System nicht erfolgen, wenn die Kolokalisierung des interagierenden Paares im selben Kompartiment (z.B. *trans*-Golgi Netzwerk) erst durch weitere virale Faktoren ermöglicht wird. Auch wenn die Erzeugung von falsch-positiven Daten im BRET-System zumindest auf räumlicher Ebene möglichst begrenzt ist, können immer noch falsch-positive Ergebnisse auf zeitlicher Basis generiert werden, denn es werden Proteine künstlich koexprimiert, die möglicherweise niemals zeitgleich in der Zelle vorkommen. Daher wäre die Anwendung des BRET-Systems im Kontext der Infektion eine attraktive Weiterentwicklung. Um die räumlichen und zeitlichen Bedingungen der infizierten Wirtszelle zu gewährleisten, könnten mittels BAC-Mutagenese Virusmutanten hergestellt werden, die ausgewählte Proteinpaare in Fusion mit den BRET-*tags* exprimieren.

Auf Grund der Abhängigkeit des BRET-Systems von der Lokalisierung der zu testenden Proteinpaare ist es besonders interessant für den Nachweis solcher PPI, an denen Membranproteine beteiligt sind. Daher sollte das BRET-System zur Validierung der in dieser Studie generierten Y2H-Daten eingesetzt

werden (Gersting *et al.*, 2011). Gleichzeitig würde sich dadurch die Eignung des BRET-Systems für die Verwendung von Membranproteinen testen lassen. Wie bereits in 4.1.3 beschrieben, ergeben sich allerdings einige Hürden, die beim Einsatz von Membranproteinen bedacht werden müssen. Zunächst sollten sowohl Donor- als auch Akzeptorfusionsprotein auf derselben Seite der Membran exponiert werden, um eine Energieübertragung zu gewährleisten. Es ist also von Vorteil, die Topologie der einzelnen Membranproteine zu kennen. Ist die Topologie allerdings unbekannt bzw. mit einer gewissen Tendenz vorhergesagt, so bietet das BRET-System ein gutes Werkzeug, um die Topologie mit Hilfe eines bekannten Interaktionspartners zu überprüfen.

Theoretisch können die BRET-Fusionsproteine sowohl mit N- als auch mit C-terminalen *tags* verwendet werden, so dass die entsprechende Interaktion in möglichst vielen Kombinationen getestet werden kann. Allerdings scheint bei den verwendeten BRET-Vektoren die Faltung des Akzeptors YFP (*yellow fluorescent protein*) behindert, wenn es als C-terminales Fusionsprotein eingesetzt wird (AG Muntau, persönliche Kommunikation). Obwohl dies bei löslichen Proteinen unproblematisch ist, da immer noch genügend Kombinationsmöglichkeiten zur Verfügung stehen, führt diese Tatsache bei Membranproteinen zu weiteren Einschränkungen. So wäre es naheliegend, die Interaktion von zwei Typ-I Membranproteinen über C-terminale Fusionsproteine, die im Cytoplasma lokalisieren, zu überprüfen. Doch wegen der genannten Problematik des Akzeptors ist diese Testkombination nur eingeschränkt möglich.

Um dennoch die PPI von Typ-I Membranproteinen miteinander austesten zu können, mussten die BRET-Vektoren modifiziert werden. Da alle HSV-1 Typ-I Membranproteine eine Signalsequenz zur kotranslationalen Insertion in das ER-Lumen kodieren, die nach erfolgter Insertion abgespalten wird, würde dabei auch der N-terminale *tag* abgetrennt werden. Daher sollte die kodierende Sequenz eines Signalpeptids vor die N-terminalen *tags* der Gateway-kompatiblen Vektoren gesetzt werden und als Insert die Signalpeptid-freien Sequenzen der entsprechenden Typ-I Proteine benutzt werden. Diese vorgezogene Signalsequenz sollte die Insertion des Membranproteins gewährleisten und nicht mit der Expression der Fusionsproteine interferieren. Obwohl exakt die gleiche Signalsequenz und Linker-Region für beide Vektoren verwendet wurde, inserierten nur die YFP-Fusionsproteine erfolgreich in die ER-Membran, während die Luciferase-Fusionsproteine (Rluc) diffus im Cytoplasma lokalisiert waren. Warum die Rluc-Fusionsproteine trotz Signalpeptid während der Translation nicht in das ER eingefädelt werden, ist unklar. Es wäre empfehlenswert, hier mit verschiedenen Signalsequenzen und Linker-Regionen zu experimentieren, die in anderen Vektoren erfolgreich verwendet werden. Mit einem erfolgreich modifizierten Rluc-Vektor, bei dem das kodierte Fusionsprotein die ER-Membran durchquert, wäre der Nachweis der PPI der Typ-I Membranproteine des HSV-1 untereinander wesentlich erleichtert.

Auf Grund der geschilderten massiven Einschränkungen beim Einsatz von Membranproteinen im BRET-System war die Auswahl an zu validierenden PPI des Y2H-Datensatzes sehr klein. Der BRET-Assay wurde mit den zu testenden Kombinationen in 96-well Mikrotiterplatten im Doppelansatz durchgeführt. Obwohl ein etabliertes Protokoll angewendet wurde (Gersting *et al.*, 2011), waren die meisten Rluc-Signale zu schwach, um eine Auswertung der BRET-Ratio durchzuführen. Deshalb wurden nur einzelne Werte repräsentativ gezeigt, um das Potenzial des BRET-Systems darzustellen. Besonders zur Differenzierung von falsch-positiven Interaktionen - also solchen PPI, die zwar bei Koexpression in der Hefezelle ein positives Signal liefern, aber im zellulären Kontext auf Grund physikalischer Barrieren nicht miteinander interagieren können - ist das BRET-System hervorragend geeignet.

Die bereits in zwei unabhängigen Y2H-Screens gezeigte Selbstinteraktion des C-terminalen, luminal exponierten Fragments des Typ-II Membranproteins pUL45 (UL45A) konnte im BRET-Assay bestätigt werden. Gleichzeitig wurden zwei Proteinpaaire überprüft, die zwar im Y2H-System eine Interaktion eingehen, allerdings anhand der Topologie von pUL45 als falsch-positiv gewertet wurden. Dabei handelte es sich um die physiologisch unmögliche Interaktion zwischen dem luminalen Fragment von pUL45 und den cyto- bzw. nukleoplasmatisch lokalisierten Proteinen pUL26 und pUL28. Die PPIs wurden in beiden möglichen Kombinationen, also mit dem N-terminalen Fusionsprotein aus YFP-UL45 bzw. Rluc-UL45 und dem jeweiligen Partner getestet und zeigten wie erwartet in beiden Fällen ein negatives Ergebnis.

Zusammenfassend wird deutlich, dass das BRET-System an sich ein hervorragendes Werkzeug zur Identifizierung von PPI in lebenden Zellen und *in situ* darstellt, sein Einsatz zum Nachweis von PPI der Membranproteine allerdings einige Einschränkungen erfährt. Um besonders die luminalen Wechselwirkungen der HSV-1 Typ-I Proteine untersuchen zu können, ist es zunächst dringend erforderlich, die Modifikation des pN-Rluc-Vektors erfolgreich abzuschließen, so dass die Rluc-Fusionsproteine durch ein vor den *tag* gelagertes Signalpeptid in die ER-Membran inseriert werden können. Darüber hinaus scheint das Protokoll besonders für den Einsatz von Membranproteinen experimentell angepasst werden zu müssen. So wäre es möglich, die Expressionsphase der Fusionsproteine von üblicherweise 48 h zu verlängern oder zu verkürzen, und dies evtl. sogar mit einer Reduktion der Inkubationstemperatur (üblicherweise 37°C) zu verbinden. Durch diese Maßnahmen könnte einerseits die Expression der Membranproteine optimiert werden, und andererseits der Degradation von möglicherweise instabilen Fusionsproteinen durch die Temperaturabnahme entgegengewirkt werden. Es ist allerdings wahrscheinlich, dass kein allgemeingültiges Protokoll für alle Paarungen gefunden werden kann, sondern dass die Anpassungen individuell erfolgen müssen. Es würde sich demnach empfehlen, die Durchführung des

BRET-Systems zunächst im kleineren Format (z.B. 24-well Mikrotiterplatten) zu realisieren, um die optimalen Bedingungen zu eruieren. Anschließend wäre ein *Upscaling* zu größerem Durchsatz im 96-well Format möglich. Insgesamt wurde deutlich, dass die Optimierung des BRET-Systems zur Verwendung von Membranproteinen umfangreicher ist als erwartet und deshalb im Rahmen dieser Arbeit nicht abgeschlossen werden konnte.

#### 5.4 Subzelluläres *trafficking* und funktionale Bedeutung der Domänen von Glykoprotein M (gM)

Während der Infektion mit Herpes simplex-Virus 1 (HSV-1) lokalisiert das Glykoprotein M (gM) an verschiedenen Membrankompartimenten innerhalb der Wirtszelle. Dazu zählen auf zellulärer Seite die innere Kernhülle (INM) und die Membranen des Sekretionsweges (Baines *et al.*, 2007; Wills *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009), während gM in der Hüllmembran von sowohl primär als auch sekundär umhüllten Viruspartikeln vorhanden ist (Baines und Roizman, 1993; Baines *et al.*, 2007; Loret *et al.*, 2008). Die Verteilung von gM zu den jeweiligen zellulären Membranen (*targeting*) scheint demnach reguliert zu sein. Möglicherweise werden durch das *targeting* von gM seine viralen Funktionen kritisch beeinflusst. Der Export von Cargoproteinen aus dem ER und damit der Eintritt in den sekretorischen Weg wird normalerweise von COPII-umhüllten Vesikeln gewährleistet. Die Konzentration von Cargoproteinen an sogenannten *exit sites* des ERs wird bei luminalen Proteinen über deren Interaktion mit Membran-verankerten Rezeptoren vermittelt (Dancourt und Barlowe, 2010). Bei integralen Membranproteinen wird der Kontakt zu Untereinheiten der COPII-Hülle direkt über verschiedene cytoplasmatisch exponierte Sequenzmotive hergestellt (Jensen und Schekman, 2011).

Da mit dem C-terminalen Fragment von gM (gM-C) im Matrix-basierten Y2H-Screen überdurchschnittlich viele Protein-Protein-Interaktionen (PPI) mit anderen viralen Komponenten gefunden wurden, war die funktionale Bedeutung dieser Domäne von besonderem Interesse. Bemerkenswerterweise führte die Deletion der C-terminalen Domäne von gM (gM $\Delta$ C) zum Verlust der Fähigkeit, das ER zu verlassen. Der cytoplasmatisch exponierte C-Terminus von gM kodiert vier potenzielle Tyrosin-basierte Motive (YXX $\phi$ ) und eine Anhäufung von sauren Aminosäuren (*acidic cluster*), die auch in den gM-Orthologen anderer Herpesviruspezies vorkommen. Diese Motive sind klassischerweise an der Sortierung von Membranproteinen in Clathrin-umhüllte Vesikel an Plasmamembran, *trans*-Golgi Netzwerk (TGN) und Endosomen beteiligt (Bonifacino und Traub, 2003). Allerdings werden besonders im Kontext der  $\alpha$ -herpesviralen Membranproteine für die sogenannten Y-Motive neben der Vermittlung von Endocytose auch alternative Funktionen diskutiert (Favoreel, 2006). So wurde gezeigt, dass ein membranahes Y-Motiv in Verbindung mit einem *acidic*

*cluster* des Glykoprotein B (gB) verschiedener Spezies für die Translokation vom ER zum Golgi-Apparat benötigt wird (Heineman *et al.*, 2000; Heineman *et al.*, 2004). Es ist möglich, dass diese Motive zur Bindung zellulärer Faktoren dienen und dadurch ER-Retentionssignale maskiert werden, oder aber dass eine direkte, jedoch hypothetische Interaktion zwischen diesen Motiven und den Elementen der COPII-Hülle stattfindet (Heineman *et al.*, 2004).

Die sequenzielle Deletion der Y-Motive und des *acidic clusters* von HSV-1 gM übte allerdings keinen Einfluss auf seine Mobilität aus. Darüber hinaus war der Austausch von gM-C mit einer unabhängigen Sequenz ausreichend, um die Exportfähigkeit aus dem ER wiederherzustellen, während gM-C alleine nicht in der Lage war, den ER-Export zu vermitteln. Daraus lässt sich ableiten, dass keines der genannten *trafficking* Motive in der C-terminalen Domäne von gM für seine Lokalisierung am TGN benötigt wird. Es wäre aber möglich, dass das *targeting* von gM zum TGN alternativ zu den C-terminalen *trafficking* Motiven durch die Bildung von Oligomeren oder die Interaktion mit anderen Partnern erbracht wird. Mit dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass die TGN-Lokalisierung von gM unabhängig von anderen viralen Faktoren ist, und auch nicht durch die Homooligomerisierung von gM gewährleistet wird. Letztendlich deutet alles darauf hin, dass gM den Golgi-Apparat entweder in Abhängigkeit von zellulären Faktoren erreicht und/oder weitere *trafficking*-Signalmotive in den cytoplasmatisch exponierten Domänen oder gar den Transmembranbereichen (TM) vorhanden sind. Zur Unterstützung dieser These sowie zur anschließenden Identifizierung weiterer *trafficking* Signale innerhalb der komplexen Struktur dieses Typ-III Membranproteins ist die experimentelle Analyse der Topologie von gM zwingend notwendig.

Zur Untersuchung von gM im virologischen Kontext wurden zwei neuartige HSV-1 Mutanten generiert, die partielle Deletionen von UL10 bzw. gM tragen (HSV-1 gM $\Delta$ C und gM $\Delta$ ac). Zusätzlich wurde eine weitere Mutante hergestellt, die im Vergleich zur Literatur über die ausgeprägteste Deletion von gM verfügt ( $\Delta$ gM), da durch die Insertion eines Stoppcodons an Aminosäureposition 3 lediglich die ersten zwei Aminosäuren kodiert werden. Hierfür wurde die zielgerichtete BAC-Mutagenese (*bacterial artificial chromosome*) mittels homologer Rekombination angewendet. Diese Methode stellt ein wertvolles Werkzeug für funktionale Charakterisierungsstudien auf Infektionsebene dar und verfügt über einige Vorzüge. Neben der einfachen Handhabbarkeit größerer Genome durch die Verwendung als BAC, sind diese darüber hinaus sehr stabil und können in großen Mengen in Bakterienstämmen produziert werden (Warden *et al.*, 2011). Im Gegensatz zur zufälligen Mutagenese mittels Transposons kann bei der Verwendung der homologen Rekombination die gewünschte Mutation zielgenau eingeführt werden. Dadurch ist es möglich, die Deletion eines Gens durch frühzeitige Stoppcodons oder *frame-shifts* zu erreichen und die Gefahr der Zerstörung *cis*-regulatorischer Elemente zu limitieren. Durch die in dieser Studie angewandte Kombination aus

nacheinander folgender positiver und negativer Selektion (Ott *et al.*, 2011) kann der Erfolg der homologen Rekombination besonders genau überwacht werden. Selbstverständlich wird die mutante BAC-DNA durch DNA-Sequenzierung erneut kontrolliert. Insgesamt bietet die BAC-Mutagenese eine sehr effiziente und darüber hinaus spurenfreie Methode zur Herstellung von Virusmutanten, die anschließend auf funktionaler Ebene charakterisiert werden können.

Die Untersuchung der Wachstumseigenschaften ist maßgeblich zur Beschreibung neuer Virusmutanten und wurde auch in dieser Studie mit den drei HSV-1 gM-Mutanten durchgeführt. Während die Deletion von gM ( $\Delta$ gM) sowie der potenziellen *trafficking* Motive (gM $\Delta$ ac) kein vom Wildtyp abweichendes Wachstum verursachen, ist die HSV-1 Mutante, die gM ohne seine cytoplasmatisch exponierte C-terminale Domäne kodiert (gM $\Delta$ C), in der Virusvermehrung und der Bildung von Plaques deutlich vermindert. Die Spezifität dieses inhibitorischen Effekts wurde durch die Rückführung dieser Mutante zum Wildtyp (Revertante) bestätigt. Darüber hinaus konnte in Zellen, die mit der gM $\Delta$ C Mutante infiziert waren, eine Zunahme an nackten Capsiden auf Kosten von umhüllten Partikeln im Cytoplasma beobachtet werden. Dies steht im Einklang mit dem Befund, dass die von HSV-1 gM $\Delta$ C produzierten extrazellulären Virionen einen Anstieg im Verhältnis der Genomkopien zur Anzahl der *plaque forming units* (pfu) zeigen. Aus diesen Analysen lässt sich schließen, dass gM $\Delta$ C, welches im ER zurückgehalten wird, einen inhibitorischen Phänotyp zeigt und die Ausbildung der sekundären Membranhülle sowie die Rekrutierung von Faktoren, die die Infektiosität der Virionen beeinflussen, behindert.

Interessanterweise ähnelt HSV-1 gM $\Delta$ C den bereits zuvor beschriebenen Deletionsmutanten von UL10 (gM) (Baines und Roizman, 1991; MacLean *et al.*, 1991; MacLean *et al.*, 1993; Browne *et al.*, 2004; Leege *et al.*, 2009). Bei all diesen Mutanten wurde die Unterbrechung des UL10 ORF durch die Insertion von Selektionskassetten erreicht, was zu mehr oder weniger stark ausgeprägten Deletionen der C-terminalen Sequenz von gM führte. Obwohl sie durchweg als Deletionsmutanten von gM bezeichnet wurden, kodieren alle weiterhin für den N-terminalen Bereich in variabler Länge von 133 bis zu 380 Aminosäuren (Volle-Länge-Protein: 473 Aminosäuren). Alle bis auf eine dieser C-terminalen Deletionsmutanten (Browne *et al.*, 2004) zeigten eine 5- bis 10-fache Reduzierung der Replikationseffizienz ähnlich der hier beschriebenen HSV-1 gM $\Delta$ C Mutante, teilweise wurde auch ein geringerer Plaque-Durchmesser im Vergleich zum Wildtyp festgestellt (MacLean *et al.*, 1991; MacLean *et al.*, 1993; Leege *et al.*, 2009). Parallel zur elektronenmikroskopischen Analyse von mit HSV-1 gM $\Delta$ C infizierten Zellen konnten auch Browne *et al.* die Zunahme von nicht-umhüllten Capsiden im Cytoplasma infizierter Zellen beobachten. Berücksichtigt man diese Fakten, stehen die Wachstumsdefekte der zuvor publizierten gM-Deletionsmutanten im Einklang mit der HSV-1 gM $\Delta$ C

Mutante aus dieser Studie und werden eher durch die Expression der verbleibenden N-terminalen Fragmente von gM verursacht als durch ein Fehlen von gM.

Der in der HSV-1 gM $\Delta$ C Mutante beobachtete Defekt der sekundären Umhüllung war unerwartet und sehr bemerkenswert, da die vollständige Deletion von gM nur einen geringen Einfluss auf das Virus hatte. Wie bereits erwähnt, enthalten viele herpesvirale Glykoproteine, darunter auch gM, in ihren cytoplasmatischen Domänen mehrere Y-Motive, die klassischerweise an der Endozytose von Membranproteinen beteiligt sind (Favoreel, 2006). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass gM zumindest im Virus-freien System die Umverteilung von sowohl zellulären als auch viralen Faktoren (darunter die am Virus *entry* beteiligten Glykoproteine D und H) von der Plasmamembran zum TGN verursacht (Crump *et al.*, 2004). Allerdings konnte die transiente Koexpression der gM-Deletionsvarianten mit gH oder gD keine Signifikanz der endozytotischen Motive der C-terminalen Domäne für ein *retrieval* von gD und gH von der Plasmamembran zum TGN nachweisen (Daten hier nicht gezeigt). Auch wurde ohne Zweifel bewiesen, dass sowohl gH als auch gD am TGN lokalisieren, unerheblich ob im viralen Kontext des HSV-1 Wildtyps oder der Mutanten gM $\Delta$ ac bzw. gM $\Delta$ C. Dieser Befund deutet daraufhin, dass die in der C-terminalen Domäne beherbergten endozytotischen Informationen entweder nicht für die Akkumulation dieser Glykoproteine am TGN benötigt oder aber durch zusätzliche Motive von gM bzw. andere virale oder zelluläre Komponenten kompensiert werden. Daher erscheint die Abwesenheit von gD und gH nicht für den beobachteten Phänotyp von HSV-1 gM $\Delta$ C verantwortlich zu sein.

Da gM $\Delta$ C nicht in der Lage ist, das ER zu verlassen, könnte der Defekt der sekundären Umhüllung durch die Mislokalisierung von viralen oder zellulären Interaktionspartnern verursacht werden. Ein solches Kandidatenprotein, das möglicherweise durch gM $\Delta$ C im ER zurückgehalten wird, ist das virale und ebenfalls konservierte Glykoprotein N (gN/UL49A), das mit gM interagiert (Fossum *et al.*, 2009; Schmidt, 2009). Analog zu Befunden der orthologen Paare ist es wahrscheinlich, dass die Interaktion zwischen dem Typ-I Protein gN über eine Disulfidbrücke zur luminalen Schleife von gM zwischen TM-Domäne 1 und 2 (Aminosäuren 49-91) vermittelt wird (Wu *et al.*, 1998; Mach *et al.*, 2000; Koyano *et al.*, 2003; Fuchs und Mettenleiter, 2005; Mach *et al.*, 2005). Diese N-terminale Domäne wird sowohl von HSV-1 gM $\Delta$ C als auch von allen anderen C-terminalen Deletionen (siehe oben) kodiert, und könnte daher den viralen Interaktionspartner gN im ER zurückhalten.

Alternativ dazu ist es denkbar, dass andere Faktoren, die normalerweise über die Bindung an die C-terminale Domäne von gM zum TGN transportiert oder in das reife Virus inkorporiert werden, durch deren Deletion nur noch ungenügend am Ort der sekundären Umhüllung lokalisieren bzw. in das Virion aufgenommen werden. Hierzu lassen sich die Daten des intraviralen Y2H-Screens heranziehen,

da dabei das C-terminale Fragment von gM (UL10) verwendet wurde. Besonders interessant ist die Interaktion mit pUL49 (VP22) (Stylianou *et al.*, 2009), die auch für das  $\alpha$ -Herpesvirus PRV gefunden wurde (Fuchs *et al.*, 2002). VP22 ist einer der Hauptbausteine der Tegumentschicht und wird am TGN in die Viruspartikel inkorporiert. Die Lokalisierung am Ort der sekundären Umhüllung wird zwar von VP22 selbst vermittelt, allerdings scheint die Aufnahme in die Partikel durch zusätzliche Faktoren gefördert zu werden (O'Regan *et al.*, 2010). Obwohl VP22 mit den cytoplasmatischen Domänen verschiedener Membranproteine - darunter gD, gE und gM - interagiert (Chi *et al.*, 2005; O'Regan *et al.*, 2007; Stylianou *et al.*, 2009), ist seine Inkorporation zumindest unabhängig von gE. Die Analyse von extrazellulären Viruspartikeln von HSV-1 gM $\Delta$ C auf Proteinebene könnte Aufschluss darüber geben, ob gM tatsächlich für den Einbau von VP22 förderlich ist. Auch wenn VP22 nicht essenziell für die Virusreplikation ist (Elliott *et al.*, 2005), so scheint es als Brücke zwischen Capsid und Virusmembran zu dienen (Hafezi *et al.*, 2005) und die Inkorporation weiterer viraler Faktoren zu beeinflussen (Elliott *et al.*, 2005). Auch der mögliche funktionale Zusammenhang von gM und *tail anchor* Membranprotein pUL56 während der sekundären Umhüllung verdient es, näher untersucht zu werden, da diese Interaktion sogar bidirektional und unter Verwendung von pUL56 als Proteinfragment sowie als Volle-Längeprotein gefunden wurde. Allerdings sind für pUL56 noch keine funktionellen Daten bekannt. Zusammenfassend ist es leicht vorstellbar, dass eine Störung des äußerst komplexen Netzwerkes während der Tegumentierung und sekundären Umhüllung zwar keine drastischen Auswirkungen auf die Partikelbildung haben muss, aber durchaus zu einer Verlangsamung des Prozesses und abweichenden Zusammensetzung der Virionen führen kann.

Da der Transport von gM zum TGN autonom von anderen viralen Faktoren stattfindet und der Wachstumsdefekt von HSV-1 gM $\Delta$ C in Abhängigkeit vom verwendeten Zelltyp unterschiedlich stark ausgeprägt ist (Jie Zhang, Montréal; Striebinger *et al.*, 2011 (submitted)), ist eine Beteiligung von zellulären Faktoren am inhibitorischen Phänotyp wahrscheinlich. Allerdings weisen die Daten dieser Studie darauf hin, dass gM $\Delta$ C weder den allgemeinen Proteintransport vom ER zum Golgi-Apparat noch die Integrität dieser beiden Kompartimente stört. Daher wird die Theorie bevorzugt, dass zelluläre Proteine durch gM zum TGN rekrutiert werden, um an der sekundären Umhüllung teilzunehmen. Tatsächlich wurde mittels massenspektrometrischer Analysen gezeigt, dass auch viele zelluläre Faktoren in reifen Viruspartikeln vorhanden sind. Dazu zählen verschiedene Rab- und Arf-Proteine (Loret *et al.*, 2008), die zu der Ras-Superfamilie der kleinen GTPasen zählen und an der Regulation von dynamischen Prozessen der intrazellulären Membranen beteiligt sind (Stenmark und Olkkonen, 2001; D'Souza-Schorey und Chavrier, 2006). Interessanterweise konnte für das gM-Ortholog von hCMV gezeigt werden, dass seine C-terminale Domäne mit dem Rab-Effektorprotein FIP4 interagiert (Krzyszaniak *et al.*, 2007). In reifen Virionen wurden ausserdem einige Proteine

identifiziert, die mit dem zellulären ESCRT-Komplex (*endosomal sorting complex required for transport*) assoziiert sind und die Knospung intraluminaler Vesikel (ILV) induzieren (Loret *et al.*, 2008; Pawliczek und Crump, 2009). Dies steht in Übereinstimmung mit dem Y2H-Screen dieser Studie, bei dem u.a. einige PPI zwischen der C-terminalen Domäne von gM und verschiedenen ESCRT-assoziierten Proteinen gefunden wurde. Anhand dieser Befunde ist es denkbar, dass gM über seine cytoplasmatisch exponierte Domäne die Rekrutierung von zellulären Faktoren zum TGN vermittelt, die an Knospungsereignissen beteiligt sind. Damit bieten die neuen HSV-1 gM Mutanten ein wertvolles Werkzeug, um die Mitwirkung von zellulären und viralen Proteinen an der sekundären Umhüllung zu untersuchen, die sowohl mit den N- als auch C-terminalen Domänen von gM interagieren.

Die HSV-1 gM $\Delta$ C Mutante zeigt neben dem Defekt in der sekundären Umhüllung auch eine Beeinträchtigung ihrer Infektiosität, da ihre Nachkommenviren einen deutlichen Anstieg im Verhältnis von Genomkopien zur Anzahl der Plaque-bildenden Einheiten (pfu) aufweist. Frühere Studien schlagen eine Wechselwirkung von gM mit der Fusionsmaschinerie vor (Klupp *et al.*, 2000; Koyano *et al.*, 2003; Crump *et al.*, 2004), allerdings sind keine Daten zur physischen Interaktion von gM mit den am Virus *entry* beteiligten gB, gD oder gH/gL bekannt. Einer interessanten Theorie zufolge ist gM daran beteiligt, virale Membranproteine in das reifende Virion aufzunehmen (Mettenleiter *et al.*, 2009). Daher könnte die C-terminale Domäne von gM für die stöchiometrische Beladung der fusionsvermittelnden Membranproteine gB, gD oder gH/gL in die Virushülle benötigt werden, die für die Effizienz des Virus *entry* und somit für die Infektiosität der Partikel entscheidend sind.

Das ER bildet den biosynthetischen Ausgangspunkt für die subzelluläre Verteilung von Membranproteinen. Von dort aus kann gM entweder zur inneren Kernhülle (INM) über die Kontinuität der ER- und Kernmembran transportiert werden (Baines *et al.*, 2007; Wills *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009) oder unter Beteiligung des Sekretionsweges zum TGN gelangen (Crump *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2009). Um die molekularen Funktion(en) von gM sowohl in der frühen als auch späten Phase des HSV-1 Replikationszyklus bzw. im Kontext der Lokalisierung aufzuklären, sollten zukünftige Studien die Identifizierung und Charakterisierung von viralen und zellulären Faktoren, die physisch mit gM interagieren, zum Ziel haben. Erste Schritte in diese Richtung wurden durch die Y2H-Analysen dieser Studie auf viraler und zellulärer Ebene bereits unternommen und dienen somit als Basis zur weitergehenden Untersuchung der Funktionalität von gM.

## 5.5 Die zelluläre ESCRT-Maschinerie als Knospungshilfe für HSV-1

Die ESCRT-Maschinerie (*endosomal sorting complex required for transport*) ist ein konservierter Mechanismus und besteht aus funktionellen Subkomplexen, die an der lysosomalen Degradation von Membranproteinen durch Bildung intraluminaler Vesikel (ILV) an Endosomen und der Biogenese von *multivesicular bodies* (MVB) beteiligt sind. Die Untereinheiten des ESCRT-Komplexes vermitteln gemeinsam die Membraneinschnürung und darauffolgende Fission des Membranhalses. Auf Grund dieser Eigenschaften wird das zelluläre ESCRT-System von einigen membranumhüllten Viren zur Knospung von Nachkommenviren ausgenutzt. Während dies vor allem für Retroviren wie HIV-1 besonders gut belegt ist (Weissenhorn und Gottlinger, 2011), verdichten sich die Hinweise auf eine Beteiligung der ESCRT-Maschinerie an der Replikation von Herpesviren (Calistri *et al.*, 2007; Crump *et al.*, 2007; Mori *et al.*, 2008; Pawliczek und Crump, 2009; Tandon *et al.*, 2009).

Um direkte Protein-Protein-Interaktionen (PPI) zwischen ESCRT-Proteinen und dem HSV-1 Proteom zu identifizieren, wurde das Hefe-2-Hybridsystem (Y2H) für genomweite, Matrix-basierte Y2H-Screens angewendet. Damit konnten insgesamt 96 PPI zwischen 14 ESCRT-assoziierten und 35 HSV-1 Proteinen bestimmt werden (siehe Abbildung 4.17). Mit Sicherheit ist dieser Datensatz als vorläufig zu betrachten, da besonders die funktionalen Bedeutungen der einzelnen PPIs noch aufgeklärt werden müssen, allerdings bietet sich eine hervorragende Ausgangssituation für weiterführende Analysen sowie ein guter Überblick über die möglichen Wechselwirkungen zwischen HSV-1 und ESCRT-Proteinen.

Um die Zahl der falsch-positiven Ergebnisse so gering wie möglich zu halten, wurden sowohl die ESCRT- als auch die HSV-1 Proteine zunächst auf ihr Potenzial zur Autoaktivierung des Y2H-Systems getestet und, falls intensiv ausgeprägt, von der Auswertung ausgeschlossen. Die Verwendung von verschiedenen Konzentrationen des *HIS3*-Inhibitors 3-AT erlaubt jedoch den Einsatz schwach autoaktivierender Fusionsproteine und gibt einen Eindruck über die Stärke der jeweiligen Wechselwirkung. Auch der Ausschluss luminaler Membranproteinfragmente verhindert falsch-positive Interaktionen der cytosolisch lokalisierten ESCRT-Proteine. Allerdings kann der Prozentsatz der falsch-negativen PPI - z.B. durch sterische und konformationelle Behinderungen der *bait* und *prey*-Fusionsdomänen - nicht beeinflusst werden und ist systemimmanent. Da keine anderen Studien zu PPI zwischen Proteinen des ESCRT-Komplexes und Herpesvirusproteinen in der Literatur vorhanden sind, kann keine Wiederfindungsrate bestimmt werden. Es ist allerdings wahrscheinlich, dass gerade die PPI der HSV-1 Membranproteine unterrepräsentiert sind, da nach wie vor einige cytoplasmatische Domänen der Membranproteine nicht in der verwendeten HSV-1 Kollektion

enthalten sind, und die Verwendung von Volle-Länge-Proteinen auf Grund ihrer hydrophoben Transmembrandomänen im Y2H-System problematisch sein kann.

Zunächst können die Y2H-Daten erneut als Netzwerk dargestellt und dessen Topologie charakterisiert werden. Auch hier findet sich parallel zu intraviralen Netzwerken (Uetz *et al.*, 2006; Fossum *et al.*, 2009) eine abweichende Topologie, die nicht als *scale-free* betrachtet werden kann. Es gibt nämlich überdurchschnittlich viele hochverknüpfte Knotenpunkte und vergleichsweise wenig periphere Knoten mit einem Verknüpfungsgrad von 1. Aus der logarithmischen Auftragung der Knotenverteilung ergibt sich eine Regressionsgerade mit einem relativ niedrigen Potenzkoeffizienten  $\gamma$ , der deutlich unter dem Wert von zellulären Netzwerken liegt. Auch gibt es keine offensichtliche Unterteilung in Submodule. Uetz *et al.* konnten jedoch zeigen, dass die Integration von intraviralen Interaktionen in übergreifende zelluläre Datensätze eine Veränderung der Netzwerktopologie bewirkt. Das Interaktom der HSV-1 Proteine mit den ESCRT-Untereinheiten gibt nur einen relativ kleinen Ausschnitt der Virus-Wirt-Interaktionen wieder, es ist daher anzunehmen, dass die Einbindung in weitere zelluläre Interaktionsnetzwerke ebenfalls zu einer skalenfreien Netzwerktopologie führen würde.

Die ESCRT-Proteine wurden zwar sowohl als *bait*- als auch als *prey*-Fusionsprotein eingesetzt, es wurden aber nur sehr wenige PPI bidirektional identifiziert. Lediglich vier Interaktionen konnten in beide Richtungen gezeigt werden, und vier weitere PPI wurden unter Verwendung von zwei Fragmenten desselben Proteins gefunden. Wie bereits beschrieben, wird in den meisten Y2H-Analysen im Hochdurchsatz nur ein relativ kleiner Teil an PPI bidirektional identifiziert (Uetz *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2008; Fossum *et al.*, 2009), was meist durch sterische oder konformationelle Behinderungen der Wechselwirkungen durch die Fusions-*tags* verursacht wird.

Insbesondere die HSV-1 Komponenten, die tatsächlich beim finalen Umhüllungsschritt in das Virion eingebaut werden, sind wahrscheinlich am Kontakt zur ESCRT-Maschinerie beteiligt, die Membranknospungsereignisse aus dem Cytoplasma heraus induziert. Um sich dem umfangreichen Y2H-Datensatz auf physiologisch relevanter Ebene zu nähern, wurde er soweit reduziert, dass nur die Interaktionen solcher HSV-1 Proteine berücksichtigt werden, die in reife Viruspartikel inkorporiert werden (Loret *et al.*, 2008). Nach dieser Sortierung bleiben 65 PPI erhalten, die 14 ESCRT-assoziierte Protein und 22 HSV-1 Proteine involvieren. Die übrigen Interaktionen sollten dabei keinesfalls als durchgehend falsch-positiv erachtet werden. Die Kombination der Y2H-Studie mit der massenspektrometrischen Analyse reifer Viruspartikel ist lediglich eine Form der Interpretation. Es ist zumindest theoretisch auch denkbar, dass die ESCRT-Proteine z.B. durch das *tail-anchor* Membranprotein pUL34 oder andere nukleär lokalisierte HSV-1 Proteine zur inneren Kernhülle

rekrutiert (INM) werden, um an der primären Umhüllung teilzunehmen. Da es allerdings bis auf diese Y2H-Daten keine weiteren experimentellen Belege für eine Funktion der ESCRT-Proteine im Nukleus gibt, bleibt dies eine spekulative Hypothese. Höchst interessant sind jedoch die im Y2H-System gefundenen PPI wie z.B. zwischen der ESCRT-I Untereinheit TSG101 und dem *nuclear egress complex* (NEC) pUL31 und pUL34. Sie sollten durch alternative Methoden bestätigt und eine mögliche Kollokalisierung an der INM fluoreszenzmikroskopisch überprüft werden.

Obwohl erstaunlich viele HSV-1 Proteine über potenzielle *late*-Domänen (L-Domänen) in ihrer Sequenz verfügen (Pawliczek und Crump, 2009), wurden mittels Y2H-Analyse kaum PPI identifiziert, die über diese vermittelt werden könnten. Für TSG101 wurden nur zwei Interaktionspartner gefunden, die ein P(T/S)AP-Motiv tragen, und ALIX interagiert mit keinem HSV-1 Protein mit potenzieller YP(X)<sub>n</sub>L-Domäne (n = 1-3). Die HECT Ubiquitin Ligasen, die an die dritte Art von L-Motiven (PPXY) binden, wurden nicht für diesen Y2H-Screen verwendet, daher kann darüber keine Aussage getroffen werden. Es ist sehr wahrscheinlich, dass viele der potenziellen Sequenzmotive in der dreidimensionalen Struktur der betreffenden Proteine verdeckt werden und folglich keine Funktion zur Rekrutierung von ESCRT-Faktoren besitzen. Obwohl die L-Domänen des HIV-1 Proteins Gag entscheidend für die erfolgreiche Knospung von Nachkommenviren sind (Martin-Serrano *et al.*, 2003; Strack *et al.*, 2003; von Schwedler *et al.*, 2003), legen Experimente mit dominant-negativen Mutanten (DN) und RNA-Interferenz (RNAi) nahe, dass die HSV-1 Produktion unabhängig von TSG101 und ALIX stattfindet (Pawliczek und Crump, 2009). Dass die über L-Domänen vermittelten Interaktionen nicht wesentlich zur HSV-1 Replikation beitragen, steht im Einklang mit den unerwartet wenigen PPI dieses Y2H-Screens mit Proteinen, die L-Motive enthalten.

Insgesamt lässt sich aus dem ESCRT/HSV-1 Interaktom im physiologischen Kontext ableiten, dass hauptsächlich die Proteine der ESCRT-I und -II Untereinheiten, die die Membranknospung induzieren, sowie SNF7B, das als ESCRT-III Protein Hauptantrieb der Membranspaltung ist und die Untereinheiten VTA1 und VPS4, die für Abbau und Recycling des ESCRT-III Komplexes sorgen, mit dem HSV-1 Proteom interagieren. Die meisten Wechselwirkungen finden nicht mit den herpesviralen Membranproteinen statt, sondern vielmehr mit Komponenten der Tegumentschicht. Es ist durchaus möglich, dass die ESCRT-Untereinheiten auch durch das Tegument zum Ort der sekundären Umhüllung rekrutiert werden, da sie in engem Kontakt zur Membran stehen. Bisher wurde lediglich die Beeinträchtigung der HSV-1 Replikation in Abwesenheit von VPS4 und aller ESCRT-III Untereinheiten gezeigt (Calistri *et al.*, 2007; Crump *et al.*, 2007; Pawliczek und Crump, 2009), die Bedeutung von ESCRT-I und -II für die Bildung von Nachkommenviren wurde allerdings noch nicht überprüft. Da hierfür besonders viele PPI identifiziert wurden, wäre es sehr aufschlussreich, mittels

RNAi oder DN-Mutanten ihren Einfluss auf die HSV-1 Replikation zu untersuchen. Die funktionale Charakterisierung der ESCRT-I und -II Komponenten bei der sekundären Umhüllung könnte durch ihre Redundanz und ihre parallele Wirkweise erschwert werden. Kollokalisierungsstudien in transfizierten und/oder infizierten Zellen sollten allerdings Hinweise auf die Teilnahme der ESCRT-I und -II Komplexe liefern.

Darüber hinaus ist es sehr wahrscheinlich, dass knospende HSV-1 Viruspartikel das ESCRT-System sehr flexibel nutzen können. Der Einsatz von DN ESCRT-III Komponenten resultierte zwar in der Reduktion der Viruspartikel im Überstand von infizierten Zellen, dennoch führte keine Mutante zur vollständigen Blockierung des viralen *egress* (Pawliczek und Crump, 2009). Demnach verhindert der Ausfall einer einzelnen ESCRT-Untereinheit nicht vollständig die Freisetzung von Nachkommenviren, was auf redundante Funktionen und alternative Möglichkeiten hinweist, den Knospungsprozess zu absolvieren. Dennoch spricht allein die Fülle der potenziellen PPI für eine Beteiligung des ESCRT-Komplexes an der HSV-1 Morphogenese und dient somit als Basis für zukünftige funktionale Studien. Dies ist ein erster Schritt zur Aufklärung der biologischen Prozesse, die sich während der sekundären Umhüllung von HSV-1 zutragen und bis heute noch größtenteils unverstanden sind. Besonders durch die Kombination von intraviralen und Virus/ESCRT Protein-Protein-Interaktionen zeichnet sich eine gute Übersicht über die Wechselwirkungen ab, die sich während der sekundären Umhüllung von HSV-1 Partikeln abspielen könnten.

In dem Modell der intraviralen und Virus-Wirt Proteininteraktionen während der sekundären Umhüllung (siehe Abbildung 4.19) fällt besonders im Zusammenhang mit der funktionalen Analyse von Membranprotein UL10 (gM) die mehrfach identifizierte Interaktion zwischen gM und *tail-anchor* Protein pUL56 auf, die beide wiederum Interaktionen mit mehreren ESCRT-Proteinen eingehen. Über pUL56 aus HSV-1 sind zwar keine experimentellen Daten bekannt, allerdings interagiert sein HSV-2 Ortholog mit verschiedenen E3-Ubiquitin-Ligasen (Ub-Ligasen) der Nedd4-Familie (Ushijima *et al.*, 2008; Ushijima *et al.*, 2009; Ushijima *et al.*, 2010). So rekrutiert HSV-2 pUL56 die Ub-Ligase Nedd4 zu TGN-Vesikeln und seine Deletion reduziert die Replikationseffizienz von HSV-2 (Ushijima *et al.*, 2009). Über ihre Funktion zur Ubiquitinierung von zum Abbau bestimmten Membranproteinen sind Ub-Ligasen ebenfalls indirekt an der Bildung intraluminaler Vesikel durch die ESCRT-Maschinerie beteiligt, da viele ESCRT-Untereinheiten an Ub binden. Es ist denkbar, dass HSV-1 pUL56 neben den identifizierten Interaktionen mit Proteinen des ESCRT-Komplexes analog zu seinem HSV-2 Ortholog ebenfalls Ub-Ligasen zum Ort der sekundären Umhüllung rekrutiert, um die Membranknospung zu induzieren. Man könnte sich vorstellen, dass gM und pUL56 kooperativ an der zukünftigen Virushülle lokalisieren und gemeinsam über die Interaktion mit der ESCRT-Maschinerie die Knospung des Partikels fördern.

Ähnlich vielversprechend erscheint auch die Untersuchung des Tegumentproteins pUL47 (VP13/14) im Zusammenhang mit der sekundären Umhüllung von HSV-1 Virionen, da es mit 7 ESCRT-Interaktionspartnern auf viraler Seite einen zentralen *hub* darstellt. Dabei handelt es sich um ein in  $\alpha$ -Herpesviren konserviert vorkommendes Protein, das als positiver Regulator der Replikation wirkt. So moduliert es die Aktivität von pUL48 (VP16), das selbst als  $\alpha$ -trans-induzierender Faktor die virale Transkription induziert, und ist als nukleocytoplasmatisches *Shuttling*- und RNA-bindendes Protein vermutlich an der RNA-Biogenese beteiligt (Zhang *et al.*, 1991; Donnelly *et al.*, 2007). Obwohl seine Deletion in HSV-1 keinen negativen Effekt auf die Replikation in Zellkultur ausübt (Barker und Roizman, 1990; Zhang *et al.*, 1991), wurde für andere Spezies der  $\alpha$ -Herpesviren eine verminderte Replikationseffizienz bzw. Plaquegröße sowie teilweise attenuierte Virulenz beobachtet (Dorange *et al.*, 2002; Kopp *et al.*, 2002; Lobanov *et al.*, 2010). Ob die Wachstumsdefekte auch durch einen Mangel an ESCRT-induzierter sekundärer Umhüllung verursacht werden, oder ob der Verlust einzelner Proteine auf Grund einer redundanten Wirkungsweise keinen Einfluss auf die Membranknospungsereignisse hat, soll durch zukünftige Studien aufgeklärt werden.

Mit dieser Arbeit ist es gelungen, eine große Anzahl an Interaktionen zwischen HSV-1 Viruskomponenten und der zellulären ESCRT-Maschinerie zu identifizieren. Neben anderen funktionalen Studien (Calistri *et al.*, 2007; Crump *et al.*, 2007; Pawliczek und Crump, 2009) impliziert dies eine Beteiligung der ESCRT-Maschinerie am viralen *egress* aus der Wirtszelle. Auf Grund der Redundanz der einzelnen ESCRT-Proteine scheint die Nutzung durch das Virus jedoch äußerst flexibel. Der Gebrauch von parallelen Strategien führt zu einer erhöhten Resistenz gegen Angriffe von außen. Dies ist das Erfolgsgeheimnis der viralen Replikation und macht HSV-1 zu einem stabilen und weit verbreiteten Krankheitserreger.

## 6 REFERENZEN

1. Alder NN and Johnson AE (2004): **Cotranslational membrane protein biogenesis at the endoplasmic reticulum.** *J Biol Chem* 279 (22): 22787-22790
2. Atanasiu D, Whitbeck JC, Cairns TM, Reilly B, Cohen GH and Eisenberg RJ (2007): **Bimolecular complementation reveals that glycoproteins gB and gH/gL of herpes simplex virus interact with each other during cell fusion.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (47): 18718-18723
3. Avitabile E, Forghieri C and Campadelli-Fiume G (2007): **Complexes between herpes simplex virus glycoproteins gD, gB, and gH detected in cells by complementation of split enhanced green fluorescent protein.** *J Virol* 81 (20): 11532-11537
4. Babst M, Wendland B, Estepa EJ and Emr SD (1998): **The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function.** *EMBO J* 17 (11): 2982-2993
5. Bacart J, Corbel C, Jockers R, Bach S and Couturier C (2008): **The BRET technology and its application to screening assays.** *Biotechnol J* 3 (3): 311-324
6. Bailer SM and Haas J (2009): **Connecting viral with cellular interactomes.** *Curr Opin Microbiol* 12 (4): 453-459
7. Baines JD and Duffy C (2006): **Nucleocapsid Assembly and Envelopment of Herpes Simplex Virus.** In *Alpha Herpesviruses: Molecular and Cellular Biology (1st Edition)*, Sandri-Goldin RM. Caister Academic Press, Norfolk, UK: 175-204
8. Baines JD, Hsieh CE, Wills E, Mannella C and Marko M (2007): **Electron tomography of nascent herpes simplex virus virions.** *J Virol* 81 (6): 2726-2735
9. Baines JD and Roizman B (1991): **The open reading frames UL3, UL4, UL10, and UL16 are dispensable for the replication of herpes simplex virus 1 in cell culture.** *J Virol* 65 (2): 938-944
10. Baines JD and Roizman B (1992): **The UL11 gene of herpes simplex virus 1 encodes a function that facilitates nucleocapsid envelopment and egress from cells.** *J Virol* 66 (8): 5168-5174
11. Baines JD and Roizman B (1993): **The UL10 gene of herpes simplex virus 1 encodes a novel viral glycoprotein, gM, which is present in the virion and in the plasma membrane of infected cells.** *J Virol* 67 (3): 1441-1452
12. Baines JD, Wills E, Jacob RJ, Pennington J and Roizman B (2007): **Glycoprotein M of herpes simplex virus 1 is incorporated into virions during budding at the inner nuclear membrane.** *J Virol* 81 (2): 800-812
13. Barabasi AL and Oltvai ZN (2004): **Network biology: understanding the cell's functional organization.** *Nat Rev Genet* 5 (2): 101-113
14. Barker DE and Roizman B (1990): **Identification of three genes nonessential for growth in cell culture near the right terminus of the unique sequences of long component of herpes simplex virus 1.** *Virology* 177 (2): 684-691
15. Bartel PL, Roecklein JA, SenGupta D and Fields S (1996): **A protein linkage map of Escherichia coli bacteriophage T7.** *Nat Genet* 12 (1): 72-77
16. Bieniasz PD (2006): **Late budding domains and host proteins in enveloped virus release.** *Virology* 344 (1): 55-63
17. Bonifacino JS and Traub LM (2003): **Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes.** *Annu Rev Biochem* 72 395-447
18. Booy FP, Newcomb WW, Trus BL, Brown JC, Baker TS and Steven AC (1991): **Liquid-crystalline, phage-like packing of encapsidated DNA in herpes simplex virus.** *Cell* 64 (5): 1007-1015

19. Boudreau RL and Davidson BL (2010): **RNAi therapeutics for CNS disorders.** *Brain Res* 1338 112-121
20. Boute N, Jockers R and Issad T (2002): **The use of resonance energy transfer in high-throughput screening: BRET versus FRET.** *Trends Pharmacol Sci* 23 (8): 351-354
21. Bowers K, Lottridge J, Helliwell SB, Goldthwaite LM, Luzio JP and Stevens TH (2004): **Protein-protein interactions of ESCRT complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** *Traffic* 5 (3): 194-210
22. Brack AR, Dijkstra JM, Granzow H, Klupp BG and Mettenleiter TC (1999): **Inhibition of virion maturation by simultaneous deletion of glycoproteins E, I, and M of pseudorabies virus.** *J Virol* 73 (7): 5364-5372
23. Browne H, Bell S and Minson T (2004): **Analysis of the requirement for glycoprotein m in herpes simplex virus type 1 morphogenesis.** *J Virol* 78 (2): 1039-1041
24. Bucks MA, O'Regan KJ, Murphy MA, Wills JW and Courtney RJ (2007): **Herpes simplex virus type 1 tegument proteins VP1/2 and UL37 are associated with intranuclear capsids.** *Virology* 361 (2): 316-324
25. Calderwood MA, Venkatesan K, Xing L, Chase MR, Vazquez A, Holthaus AM, Ewence AE, Li N, Hirozane-Kishikawa T, Hill DE, Vidal M, Kieff E and Johannsen E (2007): **Epstein-Barr virus and virus human protein interaction maps.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (18): 7606-7611
26. Calistri A, Sette P, Salata C, Cancellotti E, Forghieri C, Comin A, Gottlinger H, Campadelli-Fiume G, Palu G and Parolin C (2007): **Intracellular trafficking and maturation of herpes simplex virus type 1 gB and virus egress require functional biogenesis of multivesicular bodies.** *J Virol* 81 (20): 11468-11478
27. Campadelli-Fiume G (2007): **The egress of alphaherpesviruses from the cell.** In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunophrophylaxis (1st Edition)*, Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, et al. Cambridge University Press, Cambridge, UK: 151-162
28. Campadelli-Fiume G and Menotti L (2007): **Entry of alphaherpesviruses into the cell.** In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunophrophylaxis (1st Edition)*, Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, et al. Cambridge University Press, Cambridge, UK: 93-111
29. Campadelli-Fiume G and Roizman B (2006): **The egress of herpesviruses from cells: the unanswered questions.** *J Virol* 80 (13): 6716-6717; author replies 6717-6719
30. Chi JH, Harley CA, Mukhopadhyay A and Wilson DW (2005): **The cytoplasmic tail of herpes simplex virus envelope glycoprotein D binds to the tegument protein VP22 and to capsids.** *J Gen Virol* 86 (Pt 2): 253-261
31. Choi IR, Stenger DC and French R (2000): **Multiple interactions among proteins encoded by the mite-transmitted wheat streak mosaic tritrovirus.** *Virology* 267 (2): 185-198
32. Chouljenko VN, Iyer AV, Chowdhury S, Kim J and Kousoulas KG (2010): **The herpes simplex virus type 1 UL20 protein and the amino terminus of glycoprotein K (gK) physically interact with gB.** *J Virol* 84 (17): 8596-8606
33. Church GA and Wilson DW (1997): **Study of herpes simplex virus maturation during a synchronous wave of assembly.** *J Virol* 71 (5): 3603-3612
34. Ciruela F (2008): **Fluorescence-based methods in the study of protein-protein interactions in living cells.** *Curr Opin Biotechnol* 19 (4): 338-343
35. Clement C, Tiwari V, Scanlan PM, Valyi-Nagy T, Yue BY and Shukla D (2006): **A novel role for phagocytosis-like uptake in herpes simplex virus entry.** *J Cell Biol* 174 (7): 1009-1021
36. Cocchi F, Fusco D, Menotti L, Gianni T, Eisenberg RJ, Cohen GH and Campadelli-Fiume G (2004): **The soluble ectodomain of herpes simplex virus gD contains a membrane-proximal pro-fusion domain and suffices to mediate virus entry.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (19): 7445-7450
37. Cocchi F, Lopez M, Menotti L, Aoubala M, Dubreuil P and Campadelli-Fiume G (1998): **The V domain of herpesvirus Ig-like receptor (HIgR) contains a major functional region in herpes**

- simplex virus-1 entry into cells and interacts physically with the viral glycoprotein D.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (26): 15700-15705
38. Cockrell SK, Sanchez ME, Erazo A and Homa FL (2009): **Role of the UL25 protein in herpes simplex virus DNA encapsidation.** *J Virol* 83 (1): 47-57
39. Collier KE, Lee JI, Ueda A and Smith GA (2007): **The capsid and tegument of the alphaherpesviruses are linked by an interaction between the UL25 and VP1/2 proteins.** *J Virol* 81 (21): 11790-11797
40. Connolly SA, Jackson JO, Jardetzky TS and Longnecker R (2011): **Fusing structure and function: a structural view of the herpesvirus entry machinery.** *Nat Rev Microbiol* 9 (5): 369-381
41. Costanzo F, Campadelli-Fiume G, Foa-Tomasi L and Cassai E (1977): **Evidence that herpes simplex virus DNA is transcribed by cellular RNA polymerase B.** *J Virol* 21 (3): 996-1001
42. Crump CM, Bruun B, Bell S, Pomeranz LE, Minson T and Browne HM (2004): **Alphaherpesvirus glycoprotein M causes the relocalization of plasma membrane proteins.** *J Gen Virol* 85 (Pt 12): 3517-3527
43. Crump CM, Yates C and Minson T (2007): **Herpes simplex virus type 1 cytoplasmic envelopment requires functional Vps4.** *J Virol* 81 (14): 7380-7387
44. D'Souza-Schorey C and Chavrier P (2006): **ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 7 (5): 347-358
45. Dancourt J and Barlowe C (2010): **Protein sorting receptors in the early secretory pathway.** *Annu Rev Biochem* 79 777-802
46. Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, Pellett PE, Roizman B, Studdert MJ and Thiry E (2009): **The order Herpesvirales.** *Arch Virol* 154 (1): 171-177
47. de Bruyn Kops A, Uprichard SL, Chen M and Knipe DM (1998): **Comparison of the intranuclear distributions of herpes simplex virus proteins involved in various viral functions.** *Virology* 252 (1): 162-178
48. de Chasse B, Navratil V, Tafforeau L, Hiet MS, Aublin-Gex A, Agaoglu S, Meiffren G, Pradezynski F, Faria BF, Chantier T, Le Breton M, Pellet J, Davoust N, Mangeot PE, Chaboud A, Penin F, Jacob Y, Vidalain PO, Vidal M, Andre P, Rabourdin-Combe C and Lotteau V (2008): **Hepatitis C virus infection protein network.** *Mol Syst Biol* 4 230
49. De Matteis MA and Luini A (2008): **Exiting the Golgi complex.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 (4): 273-284
50. Desai P, Sexton GL, McCaffery JM and Person S (2001): **A null mutation in the gene encoding the herpes simplex virus type 1 UL37 polypeptide abrogates virus maturation.** *J Virol* 75 (21): 10259-10271
51. Diefenbach RJ, Miranda-Saksena M, Douglas MW and Cunningham AL (2008): **Transport and egress of herpes simplex virus in neurons.** *Rev Med Virol* 18 (1): 35-51
52. Dijkstra JM, Visser N, Mettenleiter TC and Klupp BG (1996): **Identification and characterization of pseudorabies virus glycoprotein gM as a nonessential virion component.** *J Virol* 70 (8): 5684-5688
53. Dollery SJ, Lane KD, Delboy MG, Roller DG and Nicola AV (2010): **Role of the UL45 protein in herpes simplex virus entry via low pH-dependent endocytosis and its relationship to the conformation and function of glycoprotein B.** *Virus Res* 149 (1): 115-118
54. Donnelly M, Verhagen J and Elliott G (2007): **RNA binding by the herpes simplex virus type 1 nucleocytoplasmic shuttling protein UL47 is mediated by an N-terminal arginine-rich domain that also functions as its nuclear localization signal.** *J Virol* 81 (5): 2283-2296
55. Dorange F, Tischer BK, Vautherot JF and Osterrieder N (2002): **Characterization of Marek's disease virus serotype 1 (MDV-1) deletion mutants that lack UL46 to UL49 genes: MDV-1 UL49, encoding VP22, is indispensable for virus growth.** *J Virol* 76 (4): 1959-1970
56. Ellgaard L and Helenius A (2003): **Quality control in the endoplasmic reticulum.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 4 (3): 181-191

57. Elliott G, Hafezi W, Whiteley A and Bernard E (2005): **Deletion of the herpes simplex virus VP22-encoding gene (UL49) alters the expression, localization, and virion incorporation of ICP0.** *J Virol* 79 (15): 9735-9745
58. Fabrikant G, Lata S, Riches JD, Briggs JA, Weissenhorn W and Kozlov MM (2009): **Computational model of membrane fission catalyzed by ESCRT-III.** *PLoS Comput Biol* 5 (11): e1000575
59. Farnsworth A, Goldsmith K and Johnson DC (2003): **Herpes simplex virus glycoproteins gD and gE/gI serve essential but redundant functions during acquisition of the virion envelope in the cytoplasm.** *J Virol* 77 (15): 8481-8494
60. Farnsworth A, Wisner TW and Johnson DC (2007): **Cytoplasmic residues of herpes simplex virus glycoprotein gE required for secondary envelopment and binding of tegument proteins VP22 and UL11 to gE and gD.** *J Virol* 81 (1): 319-331
61. Farnsworth A, Wisner TW, Webb M, Roller R, Cohen G, Eisenberg R and Johnson DC (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 (24): 10187-10192
62. Favoreel HW (2006): **The why's of Y-based motifs in alphaherpesvirus envelope proteins.** *Virus Res* 117 (2): 202-208
63. Fields S (2005): **High-throughput two-hybrid analysis. The promise and the peril.** *FEBS J* 272 (21): 5391-5399
64. Fields S and Song O (1989): **A novel genetic system to detect protein-protein interactions.** *Nature* 340 (6230): 245-246
65. Flajolet M, Rotondo G, Daviet L, Bergametti F, Inchauspe G, Tiollais P, Transy C and Legrain P (2000): **A genomic approach of the hepatitis C virus generates a protein interaction map.** *Gene* 242 (1-2): 369-379
66. Fossum E, Friedel CC, Rajagopala SV, Titz B, Baiker A, Schmidt T, Kraus T, Stellberger T, Rutenberg C, Suthram S, Bandyopadhyay S, Rose D, von Brunn A, Uhlmann M, Zeretzke C, Dong YA, Boulet H, Koegl M, Bailer SM, Koszinowski U, Ideker T, Uetz P, Zimmer R and Haas J (2009): **Evolutionarily conserved herpesviral protein interaction networks.** *PLoS Pathog* 5 (9): e1000570
67. Foster TP, Chouljenko VN and Kousoulas KG (2008): **Functional and physical interactions of the herpes simplex virus type 1 UL20 membrane protein with glycoprotein K.** *J Virol* 82 (13): 6310-6323
68. Fuchs W, Klupp BG, Granzow H, Hengartner C, Brack A, Mundt A, Enquist LW and Mettenleiter TC (2002): **Physical interaction between envelope glycoproteins E and M of pseudorabies virus and the major tegument protein UL49.** *J Virol* 76 (16): 8208-8217
69. Fuchs W and Mettenleiter TC (1999): **DNA sequence of the UL6 to UL20 genes of infectious laryngotracheitis virus and characterization of the UL10 gene product as a nonglycosylated and nonessential virion protein.** *J Gen Virol* 80 ( Pt 8) 2173-2182
70. Fuchs W and Mettenleiter TC (2005): **The nonessential UL49.5 gene of infectious laryngotracheitis virus encodes an O-glycosylated protein which forms a complex with the non-glycosylated UL10 gene product.** *Virus Res* 112 (1-2): 108-114
71. Fulmer PA, Melancon JM, Baines JD and Kousoulas KG (2007): **UL20 protein functions precede and are required for the UL11 functions of herpes simplex virus type 1 cytoplasmic virion envelopment.** *J Virol* 81 (7): 3097-3108
72. Fusco D, Forghieri C and Campadelli-Fiume G (2005): **The pro-fusion domain of herpes simplex virus glycoprotein D (gD) interacts with the gD N terminus and is displaced by soluble forms of viral receptors.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (26): 9323-9328
73. Gavin AC, Bosche M, Krause R, Grandi P, Marzioch M, Bauer A, Schultz J, Rick JM, Michon AM, Cruciat CM, Remor M, Hofert C, Schelder M, Brajenovic M, Ruffner H, Merino A, Klein K, Hudak M, Dickson D, Rudi T, Gnau V, Bauch A, Bastuck S, Huhse B, Leutwein C, Heurtier MA, Copley RR, Edelman A, Querfurth E, Rybin V, Drewes G, Raida M, Bouwmeester T, Bork P,

- Seraphin B, Kuster B, Neubauer G and Superti-Furga G (2002): **Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes.** *Nature* 415 (6868): 141-147
74. Gersting SW, Lotz-Havla AS and Muntau AC (2011): **Bioluminescence resonance energy transfer: an emerging tool for the detection of protein-protein interaction in living cells.** In *Methods in Molecular Biology, Vol. 815: Functional Genomics (2nd Edition)*, Kaufmann M and Klinger C. Springer, Berlin: In Press
75. Gill DJ, Teo H, Sun J, Perisic O, Veprintsev DB, Emr SD and Williams RL (2007): **Structural insight into the ESCRT-I/-II link and its role in MVB trafficking.** *EMBO J* 26 (2): 600-612
76. Giot L, Bader JS, Brouwer C, Chaudhuri A, Kuang B, Li Y, Hao YL, Ooi CE, Godwin B, Vitols E, Vijayadamar G, Pochart P, Machineni H, Welsh M, Kong Y, Zerhusen B, Malcolm R, Varrone Z, Collis A, Minto M, Burgess S, McDaniel L, Stimpson E, Spriggs F, Williams J, Neurath K, Ioime N, Agee M, Voss E, Furtak K, Renzulli R, Aanensen N, Carrolla S, Bickelhaupt E, Lazovatsky Y, DaSilva A, Zhong J, Stanyon CA, Finley RL, Jr., White KP, Braverman M, Jarvie T, Gold S, Leach M, Knight J, Shimkets RA, McKenna MP, Chant J and Rothberg JM (2003): **A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*.** *Science* 302 (5651): 1727-1736
77. Gonciarz MD, Whitby FG, Eckert DM, Kieffer C, Heroux A, Sundquist WI and Hill CP (2008): **Biochemical and structural studies of yeast Vps4 oligomerization.** *J Mol Biol* 384 (4): 878-895
78. Granzow H, Klupp BG, Fuchs W, Veits J, Osterrieder N and Mettenleiter TC (2001): **Egress of alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study.** *J Virol* 75 (8): 3675-3684
79. Gruenheid S, Gatzke L, Meadows H and Tufaro F (1993): **Herpes simplex virus infection and propagation in a mouse L cell mutant lacking heparan sulfate proteoglycans.** *J Virol* 67 (1): 93-100
80. Grunewald K, Desai P, Winkler DC, Heymann JB, Belnap DM, Baumeister W and Steven AC (2003): **Three-dimensional structure of herpes simplex virus from cryo-electron tomography.** *Science* 302 (5649): 1396-1398
81. Guo D, Rajamaki ML, Saarma M and Valkonen JP (2001): **Towards a protein interaction map of potyviruses: protein interaction matrixes of two potyviruses based on the yeast two-hybrid system.** *J Gen Virol* 82 (Pt 4): 935-939
82. Hafezi W, Bernard E, Cook R and Elliott G (2005): **Herpes simplex virus tegument protein VP22 contains an internal VP16 interaction domain and a C-terminal domain that are both required for VP22 assembly into the virus particle.** *J Virol* 79 (20): 13082-13093
83. Hartwell LH, Hopfield JJ, Leibler S and Murray AW (1999): **From molecular to modular cell biology.** *Nature* 402 (6761 Suppl): C47-52
84. Heineman TC, Connolly P, Hall SL and Assefa D (2004): **Conserved cytoplasmic domain sequences mediate the ER export of VZV, HSV-1, and HCMV gB.** *Virology* 328 (1): 131-141
85. Heineman TC, Krudwig N and Hall SL (2000): **Cytoplasmic domain signal sequences that mediate transport of varicella-zoster virus gB from the endoplasmic reticulum to the Golgi.** *J Virol* 74 (20): 9421-9430
86. Ho Y, Gruhler A, Heilbut A, Bader GD, Moore L, Adams SL, Millar A, Taylor P, Bennett K, Boutilier K, Yang L, Wolting C, Donaldson I, Schandorff S, Shewnarane J, Vo M, Taggart J, Goudreault M, Muskat B, Alfarano C, Dewar D, Lin Z, Michalickova K, Willems AR, Sassi H, Nielsen PA, Rasmussen KJ, Andersen JR, Johansen LE, Hansen LH, Jespersen H, Podtelejnikov A, Nielsen E, Crawford J, Poulsen V, Sorensen BD, Matthiesen J, Hendrickson RC, Gleeson F, Pawson T, Moran MF, Durocher D, Mann M, Hogue CW, Figgeys D and Tyers M (2002): **Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry.** *Nature* 415 (6868): 180-183
87. Hobom U, Brune W, Messerle M, Hahn G and Koszinowski UH (2000): **Fast screening procedures for random transposon libraries of cloned herpesvirus genomes: mutational analysis of human cytomegalovirus envelope glycoprotein genes.** *J Virol* 74 (17): 7720-7729

88. Honess RW and Roizman B (1974): **Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins.** *J Virol* 14 (1): 8-19
89. Hurley JH and Hanson PI (2010): **Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 11 (8): 556-566
90. Ito T, Chiba T, Ozawa R, Yoshida M, Hattori M and Sakaki Y (2001): **A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (8): 4569-4574
91. Jayachandra S, Baghian A and Kousoulas KG (1997): **Herpes simplex virus type 1 glycoprotein K is not essential for infectious virus production in actively replicating cells but is required for efficient envelopment and translocation of infectious virions from the cytoplasm to the extracellular space.** *J Virol* 71 (7): 5012-5024
92. Jensen D and Schekman R (2011): **COPII-mediated vesicle formation at a glance.** *J Cell Sci* 124 (Pt 1): 1-4
93. Jeong H, Tombor B, Albert R, Oltvai ZN and Barabasi AL (2000): **The large-scale organization of metabolic networks.** *Nature* 407 (6804): 651-654
94. Johnson DC, Frame MC, Ligas MW, Cross AM and Stow ND (1988): **Herpes simplex virus immunoglobulin G Fc receptor activity depends on a complex of two viral glycoproteins, gE and gI.** *J Virol* 62 (4): 1347-1354
95. Johnson DC and Huber MT (2002): **Directed egress of animal viruses promotes cell-to-cell spread.** *J Virol* 76 (1): 1-8
96. Johnson DC and Spear PG (1982): **Monensin inhibits the processing of herpes simplex virus glycoproteins, their transport to the cell surface, and the egress of virions from infected cells.** *J Virol* 43 (3): 1102-1112
97. Johnson DC, Webb M, Wisner TW and Brunetti C (2001): **Herpes simplex virus gE/gI sorts nascent virions to epithelial cell junctions, promoting virus spread.** *J Virol* 75 (2): 821-833
98. Johnson DC, Wisner TW and Wright CC (2011): **Herpes simplex virus gB and gD function in a redundant fashion to promote secondary envelopment.** *J Virol*
99. Jons A, Dijkstra JM and Mettenleiter TC (1998): **Glycoproteins M and N of pseudorabies virus form a disulfide-linked complex.** *J Virol* 72 (1): 550-557
100. Katzmann DJ, Odorizzi G and Emr SD (2002): **Receptor downregulation and multivesicular-body sorting.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 (12): 893-905
101. Kelly BJ, Fraefel C, Cunningham AL and Diefenbach RJ (2009): **Functional roles of the tegument proteins of herpes simplex virus type 1.** *Virus Res* 145 (2): 173-186
102. Kieffer C, Skalicky JJ, Morita E, De Domenico I, Ward DM, Kaplan J and Sundquist WI (2008): **Two distinct modes of ESCRT-III recognition are required for VPS4 functions in lysosomal protein targeting and HIV-1 budding.** *Dev Cell* 15 (1): 62-73
103. Klupp B, Altenschmidt J, Granzow H, Fuchs W and Mettenleiter TC (2008): **Glycoproteins required for entry are not necessary for egress of pseudorabies virus.** *J Virol* 82 (13): 6299-6309
104. Klupp BG, Bottcher S, Granzow H, Kopp M and Mettenleiter TC (2005): **Complex formation between the UL16 and UL21 tegument proteins of pseudorabies virus.** *J Virol* 79 (3): 1510-1522
105. Klupp BG, Granzow H, Fuchs W, Keil GM, Finke S and Mettenleiter TC (2007): **Vesicle formation from the nuclear membrane is induced by coexpression of two conserved herpesvirus proteins.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (17): 7241-7246
106. Klupp BG, Nixdorf R and Mettenleiter TC (2000): **Pseudorabies virus glycoprotein M inhibits membrane fusion.** *J Virol* 74 (15): 6760-6768
107. Kopp M, Klupp BG, Granzow H, Fuchs W and Mettenleiter TC (2002): **Identification and characterization of the pseudorabies virus tegument proteins UL46 and UL47: role for UL47 in virion morphogenesis in the cytoplasm.** *J Virol* 76 (17): 8820-8833

108. Kostelansky MS, Sun J, Lee S, Kim J, Ghirlando R, Hierro A, Emr SD and Hurley JH (2006): **Structural and functional organization of the ESCRT-I trafficking complex.** *Cell* 125 (1): 113-126
109. Koyano S, Mar EC, Stamey FR and Inoue N (2003): **Glycoproteins M and N of human herpesvirus 8 form a complex and inhibit cell fusion.** *J Gen Virol* 84 (Pt 6): 1485-1491
110. Krummenacher C, Rux AH, Whitbeck JC, Ponce-de-Leon M, Lou H, Baribaud I, Hou W, Zou C, Geraghty RJ, Spear PG, Eisenberg RJ and Cohen GH (1999): **The first immunoglobulin-like domain of HveC is sufficient to bind herpes simplex virus gD with full affinity, while the third domain is involved in oligomerization of HveC.** *J Virol* 73 (10): 8127-8137
111. Krummenacher C, Supekar VM, Whitbeck JC, Lazear E, Connolly SA, Eisenberg RJ, Cohen GH, Wiley DC and Carfi A (2005): **Structure of unliganded HSV gD reveals a mechanism for receptor-mediated activation of virus entry.** *EMBO J* 24 (23): 4144-4153
112. Krzyzaniak M, Mach M and Britt WJ (2007): **The cytoplasmic tail of glycoprotein M (gpUL100) expresses trafficking signals required for human cytomegalovirus assembly and replication.** *J Virol* 81 (19): 10316-10328
113. Landsberg MJ, Vajjhala PR, Rothnagel R, Munn AL and Hankamer B (2009): **Three-dimensional structure of AAA ATPase Vps4: advancing structural insights into the mechanisms of endosomal sorting and enveloped virus budding.** *Structure* 17 (3): 427-437
114. Lee JH, Vittone V, Diefenbach E, Cunningham AL and Diefenbach RJ (2008): **Identification of structural protein-protein interactions of herpes simplex virus type 1.** *Virology* 378 (2): 347-354
115. Leege T, Fuchs W, Granzow H, Kopp M, Klupp BG and Mettenleiter TC (2009): **Effects of simultaneous deletion of pUL11 and glycoprotein M on virion maturation of herpes simplex virus type 1.** *J Virol* 83 (2): 896-907
116. Lehman IR and Boehmer PE (1999): **Replication of herpes simplex virus DNA.** *J Biol Chem* 274 (40): 28059-28062
117. Li S, Armstrong CM, Bertin N, Ge H, Milstein S, Boxem M, Vidalain PO, Han JD, Chesneau A, Hao T, Goldberg DS, Li N, Martinez M, Rual JF, Lamesch P, Xu L, Tewari M, Wong SL, Zhang LV, Berriz GF, Jacotot L, Vaglio P, Reboul J, Hirozane-Kishikawa T, Li Q, Gabel HW, Elewa A, Baumgartner B, Rose DJ, Yu H, Bosak S, Sequerra R, Fraser A, Mango SE, Saxton WM, Strome S, Van Den Heuvel S, Piano F, Vandenhoute J, Sardet C, Gerstein M, Doucette-Stamm L, Gunsalus KC, Harper JW, Cusick ME, Roth FP, Hill DE and Vidal M (2004): **A map of the interactome network of the metazoan *C. elegans*.** *Science* 303 (5657): 540-543
118. Lobanov VA, Maher-Sturgess SL, Snider MG, Lawman Z, Babiuk LA and van Drunen Littel-van den Hurk S (2010): **A UL47 gene deletion mutant of bovine herpesvirus type 1 exhibits impaired growth in cell culture and lack of virulence in cattle.** *J Virol* 84 (1): 445-458
119. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D and Darnell J (2000): **Protein Sorting: Organelle Biogenesis and Protein Secretion.** In *Molecular Cell Biology (4th Edition)*, W.H. Freeman, New York:
120. Loregian A and Palu G (2005): **Disruption of the interactions between the subunits of herpesvirus DNA polymerases as a novel antiviral strategy.** *Clin Microbiol Infect* 11 (6): 437-446
121. Loret S, Guay G and Lippe R (2008): **Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions.** *J Virol* 82 (17): 8605-8618
122. Lyman MG and Enquist LW (2009): **Herpesvirus interactions with the host cytoskeleton.** *J Virol* 83 (5): 2058-2066
123. Mach M, Kropff B, Dal Monte P and Britt W (2000): **Complex formation by human cytomegalovirus glycoproteins M (gpUL100) and N (gpUL73).** *J Virol* 74 (24): 11881-11892
124. Mach M, Kropff B, Krzyzaniak M and Britt W (2005): **Complex formation by glycoproteins M and N of human cytomegalovirus: structural and functional aspects.** *J Virol* 79 (4): 2160-2170

125. MacLean CA, Efstathiou S, Elliott ML, Jamieson FE and McGeoch DJ (1991): **Investigation of herpes simplex virus type 1 genes encoding multiply inserted membrane proteins.** *J Gen Virol* 72 ( Pt 4) 897-906
126. MacLean CA, Robertson LM and Jamieson FE (1993): **Characterization of the UL10 gene product of herpes simplex virus type 1 and investigation of its role in vivo.** *J Gen Virol* 74 ( Pt 6) 975-983
127. Martin-Serrano J, Yarovoy A, Perez-Caballero D and Bieniasz PD (2003): **Divergent retroviral late-budding domains recruit vacuolar protein sorting factors by using alternative adaptor proteins.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (21): 12414-12419
128. Maurer UE, Sodeik B and Grunewald K (2008): **Native 3D intermediates of membrane fusion in herpes simplex virus 1 entry.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (30): 10559-10564
129. Maxwell KL and Frappier L (2007): **Viral proteomics.** *Microbiol Mol Biol Rev* 71 (2): 398-411
130. May JS, Colaco S and Stevenson PG (2005): **Glycoprotein M is an essential lytic replication protein of the murine gammaherpesvirus 68.** *J Virol* 79 (6): 3459-3467
131. May JS, Smith CM, Gill MB and Stevenson PG (2008): **An essential role for the proximal but not the distal cytoplasmic tail of glycoprotein M in murid herpesvirus 4 infection.** *PLoS One* 3 (5): e2131
132. McCraith S, Holtzman T, Moss B and Fields S (2000): **Genome-wide analysis of vaccinia virus protein-protein interactions.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (9): 4879-4884
133. McGeoch DJ, Dalrymple MA, Davison AJ, Dolan A, Frame MC, McNab D, Perry LJ, Scott JE and 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) 1531-1574
134. McGeoch DJ, Rixon FJ and Davison AJ (2006): **Topics in herpesvirus genomics and evolution.** *Virus Res* 117 (1): 90-104
135. McKeown L, Robinson P, Greenwood SM, Hu W and Jones OT (2006): **PIN-G--a novel reporter for imaging and defining the effects of trafficking signals in membrane proteins.** *BMC Biotechnol* 6 15
136. Melancon JM, Fulmer PA and Kousoulas KG (2007): **The herpes simplex virus UL20 protein functions in glycoprotein K (gK) intracellular transport and virus-induced cell fusion are independent of UL20 functions in cytoplasmic virion envelopment.** *Virology* 4 120
137. Melancon JM, Luna RE, Foster TP and Kousoulas KG (2005): **Herpes simplex virus type 1 gK is required for gB-mediated virus-induced cell fusion, while neither gB and gK nor gB and UL20p function redundantly in virion de-envelopment.** *J Virol* 79 (1): 299-313
138. Mendez-Rios J and Uetz P (2010): **Global approaches to study protein-protein interactions among viruses and hosts.** *Future Microbiol* 5 (2): 289-301
139. Mercorelli B, Lembo D, Palu G and Loregian A (2011): **Early inhibitors of human cytomegalovirus: state-of-art and therapeutic perspectives.** *Pharmacol Ther* 131 (3): 309-329
140. Mettenleiter TC (2004): **Budding events in herpesvirus morphogenesis.** *Virus Res* 106 (2): 167-180
141. Mettenleiter TC (2006): **Intriguing interplay between viral proteins during herpesvirus assembly or: the herpesvirus assembly puzzle.** *Vet Microbiol* 113 (3-4): 163-169
142. Mettenleiter TC, Klupp BG and Granzow H (2009): **Herpesvirus assembly: an update.** *Virus Res* 143 (2): 222-234
143. Modrow S, Falke D, Truyen U and Schaetzel H (2010): **Herpesviren.** In *Molekulare Virologie (3. Auflage)*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg: 544-634
144. Montgomery RI, Warner MS, Lum BJ and Spear PG (1996): **Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family.** *Cell* 87 (3): 427-436
145. Mori Y, Koike M, Moriishi E, Kawabata A, Tang H, Oyaizu H, Uchiyama Y and Yamanishi K (2008): **Human herpesvirus-6 induces MVB formation, and virus egress occurs by an exosomal release pathway.** *Traffic* 9 (10): 1728-1742

146. Morita E and Sundquist WI (2004): **Retrovirus budding.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 20 395-425
147. Mossman KL, Sherburne R, Lavery C, Duncan J and Smiley JR (2000): **Evidence that herpes simplex virus VP16 is required for viral egress downstream of the initial envelopment event.** *J Virol* 74 (14): 6287-6299
148. Mou F, Wills EG, Park R and Baines JD (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 (16): 8094-8104
149. Nagel CH, Dohner K, Fathollahy M, Strive T, Borst EM, Messerle M and Sodeik B (2008): **Nuclear egress and envelopment of herpes simplex virus capsids analyzed with dual-color fluorescence HSV1(17+).** *J Virol* 82 (6): 3109-3124
150. Newcomb WW, Juhas RM, Thomsen DR, Homa FL, Burch AD, Weller SK and Brown JC (2001): **The UL6 gene product forms the portal for entry of DNA into the herpes simplex virus capsid.** *J Virol* 75 (22): 10923-10932
151. Newman MEJ (2003): **The structure and function of complex networks.** *SIAM Review* 45 (2): 167-256
152. Nicola AV and Straus SE (2004): **Cellular and viral requirements for rapid endocytic entry of herpes simplex virus.** *J Virol* 78 (14): 7508-7517
153. O'Regan KJ, Brignati MJ, Murphy MA, Bucks MA and Courtney RJ (2010): **Virion incorporation of the herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 is facilitated by trans-Golgi network localization and is independent of interaction with glycoprotein E.** *Virology* 405 (1): 176-192
154. O'Regan KJ, Bucks MA, Murphy MA, Wills JW and Courtney RJ (2007): **A conserved region of the herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 facilitates interaction with the cytoplasmic tail of glycoprotein E (gE).** *Virology* 358 (1): 192-200
155. Obita T, Saksena S, Ghazi-Tabatabai S, Gill DJ, Perisic O, Emr SD and Williams RL (2007): **Structural basis for selective recognition of ESCRT-III by the AAA ATPase Vps4.** *Nature* 449 (7163): 735-739
156. Ojala PM, Sodeik B, Ebersold MW, Kutay U and 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 (13): 4922-4931
157. Okamoto K and Murawaki Y (2011): **The Therapeutic Potential of RNA Interference: Novel Approaches for Cancer Treatment.** *Curr Pharm Biotechnol*
158. Osterrieder N, Neubauer A, Brandmuller C, Braun B, Kaaden OR and Baines JD (1996): **The equine herpesvirus 1 glycoprotein gp21/22a, the herpes simplex virus type 1 gM homolog, is involved in virus penetration and cell-to-cell spread of virions.** *J Virol* 70 (6): 4110-4115
159. Ott M, Tascher G, Hassdenteufel S, Zimmermann R, Haas J and Bailer SM (2011): **Functional characterization of the essential tail-anchor of the HSV-1 nuclear egress protein UL34.** *J Gen Virol*
160. Parent LJ, Bennett RP, Craven RC, Nelle TD, Krishna NK, Bowzard JB, Wilson CB, Puffer BA, Montelaro RC and Wills JW (1995): **Positionally independent and exchangeable late budding functions of the Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus Gag proteins.** *J Virol* 69 (9): 5455-5460
161. Park R and Baines JD (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 (1): 494-504
162. Pawliczek T and Crump CM (2009): **Herpes simplex virus type 1 production requires a functional ESCRT-III complex but is independent of TSG101 and ALIX expression.** *J Virol* 83 (21): 11254-11264
163. Pellett PE and Roizman B (2007): **The Family Herpesviridae: A Brief Introduction.** In *Fields Virology (5th Edition)*, Knipe DM and Howley PM. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia: 2479-2499

164. Perez-Romero P, Perez A, Capul A, Montgomery R and Fuller AO (2005): **Herpes simplex virus entry mediator associates in infected cells in a complex with viral proteins gD and at least gH.** *J Virol* 79 (7): 4540-4544
165. Poffenberger KL and Roizman B (1985): **A noninverting genome of a viable herpes simplex virus 1: presence of head-to-tail linkages in packaged genomes and requirements for circularization after infection.** *J Virol* 53 (2): 587-595
166. Pollard TD, Earnshaw WC and Lippincott-Schwartz J (2007): **Endoplasmic Reticulum.** In *Cell Biology (2nd Edition)*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg: 345-363
167. Quinlan MP, Chen LB and Knipe DM (1984): **The intranuclear location of a herpes simplex virus DNA-binding protein is determined by the status of viral DNA replication.** *Cell* 36 (4): 857-868
168. Rabu C, Schmid V, Schwappach B and High S (2009): **Biogenesis of tail-anchored proteins: the beginning for the end?** *J Cell Sci* 122 (Pt 20): 3605-3612
169. Raiborg C and Stenmark H (2009): **The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins.** *Nature* 458 (7237): 445-452
170. Rajcani J, Andrea V and Ingeborg R (2004): **Peculiarities of herpes simplex virus (HSV) transcription: an overview.** *Virus Genes* 28 (3): 293-310
171. Raman K and Chandra N (2008): **Mycobacterium tuberculosis interactome analysis unravels potential pathways to drug resistance.** *BMC Microbiol* 8 234
172. Rapoport TA, Goder V, Heinrich SU and Matlack KE (2004): **Membrane-protein integration and the role of the translocation channel.** *Trends Cell Biol* 14 (10): 568-575
173. Raymond CK, Howald-Stevenson I, Vater CA and Stevens TH (1992): **Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants.** *Mol Biol Cell* 3 (12): 1389-1402
174. Remillard-Labrosse G, Guay G and Lippe R (2006): **Reconstitution of herpes simplex virus type 1 nuclear capsid egress in vitro.** *J Virol* 80 (19): 9741-9753
175. Ren X and Hurley JH (2010): **VHS domains of ESCRT-0 cooperate in high-avidity binding to polyubiquitinated cargo.** *EMBO J* 29 (6): 1045-1054
176. Reynolds AE, Liang L and Baines JD (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 (11): 5564-5575
177. Reynolds AE, Ryckman BJ, Baines JD, Zhou Y, Liang L and Roller RJ (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 (18): 8803-8817
178. Reynolds AE, Wills EG, Roller RJ, Ryckman BJ and Baines JD (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 (17): 8939-8952
179. Roizman B, Knipe DM and Whiteley RJ (2007): **Herpes Simplex Viruses.** In *Fields Virology (5th Edition)*, Knipe DM and Howley PM. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia: 2501-2601
180. Roller RJ, Zhou Y, Schnetzer R, Ferguson J and DeSalvo D (2000): **Herpes simplex virus type 1 U(L)34 gene product is required for viral envelopment.** *J Virol* 74 (1): 117-129
181. Roop C, Hutchinson L and Johnson DC (1993): **A mutant herpes simplex virus type 1 unable to express glycoprotein L cannot enter cells, and its particles lack glycoprotein H.** *J Virol* 67 (4): 2285-2297
182. Rozen R, Sathish N, Li Y and Yuan Y (2008): **Virion-wide protein interactions of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus.** *J Virol* 82 (10): 4742-4750
183. Rual JF, Hirozane-Kishikawa T, Hao T, Bertin N, Li S, Dricot A, Li N, Rosenberg J, Lamesch P, Vidalain PO, Clingingsmith TR, Hartley JL, Esposito D, Cheo D, Moore T, Simmons B, Sequerra R, Bosak S, Doucette-Stamm L, Le Peuch C, Vandenhaute J, Cusick ME, Albala JS, Hill DE and

- Vidal M (2004): **Human ORFeome version 1.1: a platform for reverse proteomics.** *Genome Res* 14 (10B): 2128-2135
184. Rual JF, Venkatesan K, Hao T, Hirozane-Kishikawa T, Dricot A, Li N, Berriz GF, Gibbons FD, Dreze M, Ayivi-Guedehoussou N, Klitgord N, Simon C, Boxem M, Milstein S, Rosenberg J, Goldberg DS, Zhang LV, Wong SL, Franklin G, Li S, Albala JS, Lim J, Fraughton C, Llamas E, Cevik S, Bex C, Lamesch P, Sikorski RS, Vandenhaute J, Zoghbi HY, Smolyar A, Bosak S, Sequerra R, Doucette-Stamm L, Cusick ME, Hill DE, Roth FP and Vidal M (2005): **Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network.** *Nature* 437 (7062): 1173-1178
185. Sadaoka T, Yanagi T, Yamanishi K and Mori Y (2010): **Characterization of the varicella-zoster virus ORF50 gene, which encodes glycoprotein M.** *J Virol* 84 (7): 3488-3502
186. Sadlish H, Pitonzo D, Johnson AE and Skach WR (2005): **Sequential triage of transmembrane segments by Sec61alpha during biogenesis of a native multispinning membrane protein.** *Nat Struct Mol Biol* 12 (10): 870-878
187. Schmidt T (2009): **Identifizierung und Charakterisierung komplexer Protein-Interaktionen des Herpes simplex-Virus 1.** *Dissertation*: Universität des Saarlandes, Homburg /Saar
188. Scott A, Chung HY, Gonciarz-Swiatek M, Hill GC, Whitby FG, Gaspar J, Holton JM, Viswanathan R, Ghaffarian S, Hill CP and Sundquist WI (2005): **Structural and mechanistic studies of VPS4 proteins.** *EMBO J* 24 (20): 3658-3669
189. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B and Ideker T (2003): **Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks.** *Genome Res* 13 (11): 2498-2504
190. Shapira SD, Gat-Viks I, Shum BO, Dricot A, de Grace MM, Wu L, Gupta PB, Hao T, Silver SJ, Root DE, Hill DE, Regev A and Hacohen N (2009): **A physical and regulatory map of host-influenza interactions reveals pathways in H1N1 infection.** *Cell* 139 (7): 1255-1267
191. Shiba C, Daikoku T, Goshima F, Takakuwa H, Yamauchi Y, Koiwai O and 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 (Pt 10): 2397-2405
192. Shukla D, Liu J, Blaiklock P, Shworak NW, Bai X, Esko JD, Cohen GH, Eisenberg RJ, Rosenberg RD and Spear PG (1999): **A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry.** *Cell* 99 (1): 13-22
193. Simpson-Holley M, Colgrove RC, Nalepa G, Harper JW and Knipe DM (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 (20): 12840-12851
194. Skepper JN, Whiteley A, Browne H and Minson A (2001): **Herpes simplex virus nucleocapsids mature to progeny virions by an envelopment --> deenvelopment --> reenvelopment pathway.** *J Virol* 75 (12): 5697-5702
195. Sodeik B, Ebersold MW and Helenius A (1997): **Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus.** *J Cell Biol* 136 (5): 1007-1021
196. Spear PG (2004): **Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry.** *Cell Microbiol* 6 (5): 401-410
197. Spear PG, Eisenberg RJ and Cohen GH (2000): **Three classes of cell surface receptors for alphaherpesvirus entry.** *Virology* 275 (1): 1-8
198. Spear PG, Shieh MT, Herold BC, WuDunn D and Koshy TI (1992): **Heparan sulfate glycosaminoglycans as primary cell surface receptors for herpes simplex virus.** *Adv Exp Med Biol* 313 341-353
199. Stagljar I, Korostensky C, Johnsson N and te Heesen S (1998): **A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins in vivo.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (9): 5187-5192
200. Stannard LM, Himmelhoch S and Wynchank S (1996): **Intra-nuclear localization of two envelope proteins, gB and gD, of herpes simplex virus.** *Arch Virol* 141 (3-4): 505-524

201. Stellberger T, Hauser R, Baiker A, Pothineni VR, Haas J and Uetz P (2010): **Improving the yeast two-hybrid system with permuted fusions proteins: the Varicella Zoster Virus interactome.** *Proteome Sci* 8 8
202. Stelzl U, Worm U, Lalowski M, Haenig C, Brembeck FH, Goehler H, Stroedicke M, Zenkner M, Schoenherr A, Koeppen S, Timm J, Mintzlaff S, Abraham C, Bock N, Kietzmann S, Goedde A, Toksoz E, Droege A, Krobitsch S, Korn B, Birchmeier W, Lehrach H and Wanker EE (2005): **A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome.** *Cell* 122 (6): 957-968
203. Stenmark H and Olkkonen VM (2001): **The Rab GTPase family.** *Genome Biol* 2 (5): REVIEWS3007
204. Stingley SW, Ramirez JJ, Aguilar SA, Simmen K, Sandri-Goldin RM, Ghazal P and Wagner EK (2000): **Global analysis of herpes simplex virus type 1 transcription using an oligonucleotide-based DNA microarray.** *J Virol* 74 (21): 9916-9927
205. Stow ND (2001): **Packaging of genomic and amplicon DNA by the herpes simplex virus type 1 UL25-null mutant KUL25NS.** *J Virol* 75 (22): 10755-10765
206. Strack B, Calistri A, Craig S, Popova E and Gottlinger HG (2003): **AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding.** *Cell* 114 (6): 689-699
207. Strang BL and Stow ND (2005): **Circularization of the herpes simplex virus type 1 genome upon lytic infection.** *J Virol* 79 (19): 12487-12494
208. Striebinger H, Zhang J, Ott M, Duron J, Ruzsics Z, Haas J, Lippe R and Bailer SM (2011 (submitted)): **Subcellular trafficking and functional importance of Herpes simplex virus-1 Glycoprotein M domains.** *J Gen Virol*
209. Strom T and Frenkel N (1987): **Effects of herpes simplex virus on mRNA stability.** *J Virol* 61 (7): 2198-2207
210. Stuchell-Brereton MD, Skalicky JJ, Kieffer C, Karren MA, Ghaffarian S and Sundquist WI (2007): **ESCRT-III recognition by VPS4 ATPases.** *Nature* 449 (7163): 740-744
211. Stylianou J, Maringer K, Cook R, Bernard E and Elliott G (2009): **Virion incorporation of the herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 occurs via glycoprotein E-specific recruitment to the late secretory pathway.** *J Virol* 83 (10): 5204-5218
212. Subramanian RP and Geraghty RJ (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 (8): 2903-2908
213. Sugimoto K, Uema M, Sagara H, Tanaka M, Sata T, Hashimoto Y and 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 (11): 5198-5211
214. Tandon R, AuCoin DP and Mocarski ES (2009): **Human cytomegalovirus exploits ESCRT machinery in the process of virion maturation.** *J Virol* 83 (20): 10797-10807
215. Taylor TJ, Brockman MA, McNamee EE and Knipe DM (2002): **Herpes simplex virus.** *Front Biosci* 7 d752-764
216. Teo H, Gill DJ, Sun J, Perisic O, Veprintsev DB, Vallis Y, Emr SD and Williams RL (2006): **ESCRT-I core and ESCRT-II GLUE domain structures reveal role for GLUE in linking to ESCRT-I and membranes.** *Cell* 125 (1): 99-111
217. Tischer BK, Schumacher D, Messerle M, Wagner M and Osterrieder N (2002): **The products of the UL10 (gM) and the UL49.5 genes of Marek's disease virus serotype 1 are essential for virus growth in cultured cells.** *J Gen Virol* 83 (Pt 5): 997-1003
218. Titz B, Schlesner M and Uetz P (2004): **What do we learn from high-throughput protein interaction data?** *Expert Rev Proteomics* 1 (1): 111-121
219. Torrisi MR, Di Lazzaro C, Pavan A, Pereira L and Campadelli-Fiume G (1992): **Herpes simplex virus envelopment and maturation studied by fracture label.** *J Virol* 66 (1): 554-561

220. Trus BL, Booy FP, Newcomb WW, Brown JC, Homa FL, Thomsen DR and Steven AC (1996): **The herpes simplex virus procapsid: structure, conformational changes upon maturation, and roles of the triplex proteins VP19c and VP23 in assembly.** *J Mol Biol* 263 (3): 447-462
221. Turcotte S, Letellier J and 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 (14): 8847-8860
222. Uetz P, Dong YA, Zeretzke C, Atzler C, Baiker A, Berger B, Rajagopala SV, Roupelieva M, Rose D, Fossum E and Haas J (2006): **Herpesviral protein networks and their interaction with the human proteome.** *Science* 311 (5758): 239-242
223. Uetz P, Giot L, Cagney G, Mansfield TA, Judson RS, Knight JR, Lockshon D, Narayan V, Srinivasan M, Pochart P, Qureshi-Emili A, Li Y, Godwin B, Conover D, Kalbfleisch T, Vijayadamodar G, Yang M, Johnston M, Fields S and Rothberg JM (2000): **A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Nature* 403 (6770): 623-627
224. Uetz P, Rajagopala SV, Dong YA and Haas J (2004): **From ORFeomes to protein interaction maps in viruses.** *Genome Res* 14 (10B): 2029-2033
225. Ushijima Y, Goshima F, Kimura H and Nishiyama Y (2009): **Herpes simplex virus type 2 tegument protein UL56 relocalizes ubiquitin ligase Nedd4 and has a role in transport and/or release of virions.** *Virology* 396 (1): 168
226. Ushijima Y, Koshizuka T, Goshima F, Kimura H and Nishiyama Y (2008): **Herpes simplex virus type 2 UL56 interacts with the ubiquitin ligase Nedd4 and increases its ubiquitination.** *J Virol* 82 (11): 5220-5233
227. Ushijima Y, Luo C, Kamakura M, Goshima F, Kimura H and Nishiyama Y (2010): **Herpes simplex virus UL56 interacts with and regulates the Nedd4-family ubiquitin ligase Itch.** *Virology* 401 (1): 179
228. Varmuza SL and Smiley JR (1985): **Signals for site-specific cleavage of HSV DNA: maturation involves two separate cleavage events at sites distal to the recognition sequences.** *Cell* 41 (3): 793-802
229. Vidal M, Cusick ME and Barabasi AL (2011): **Interactome networks and human disease.** *Cell* 144 (6): 986-998
230. Vittone V, Diefenbach E, Triffett D, Douglas MW, Cunningham AL and Diefenbach RJ (2005): **Determination of interactions between tegument proteins of herpes simplex virus type 1.** *J Virol* 79 (15): 9566-9571
231. von Heijne G (2007): **The membrane protein universe: what's out there and why bother?** *J Intern Med* 261 (6): 543-557
232. von Schwedler UK, Stuchell M, Muller B, Ward DM, Chung HY, Morita E, Wang HE, Davis T, He GP, Cimbara DM, Scott A, Krausslich HG, Kaplan J, Morham SG and Sundquist WI (2003): **The protein network of HIV budding.** *Cell* 114 (6): 701-713
233. Wagner A and Fell DA (2001): **The small world inside large metabolic networks.** *Proc Biol Sci* 268 (1478): 1803-1810
234. Warden C, Tang Q and Zhu H (2011): **Herpesvirus BACs: past, present, and future.** *J Biomed Biotechnol* 2011 124595
235. Warming S, Costantino N, Court DL, Jenkins NA and Copeland NG (2005): **Simple and highly efficient BAC recombineering using galK selection.** *Nucleic Acids Res* 33 (4): e36
236. Watts DJ and Strogatz SH (1998): **Collective dynamics of 'small-world' networks.** *Nature* 393 (6684): 440-442
237. Weissenhorn W and Gottlinger H (2011): **Essential ingredients for HIV-1 budding.** *Cell Host Microbe* 9 (3): 172-174
238. Welsch S, Muller B and Krausslich HG (2007): **More than one door - Budding of enveloped viruses through cellular membranes.** *FEBS Lett* 581 (11): 2089-2097

239. Wild P, Engels M, Senn C, Tobler K, Ziegler U, Schraner EM, Loepfe E, Ackermann M, Mueller M and Walther P (2005): **Impairment of nuclear pores in bovine herpesvirus 1-infected MDBK cells.** *J Virol* 79 (2): 1071-1083
240. Wild P, Senn C, Manera CL, Sutter E, Schraner EM, Tobler K, Ackermann M, Ziegler U, Lucas MS and Kaech A (2009): **Exploring the nuclear envelope of herpes simplex virus 1-infected cells by high-resolution microscopy.** *J Virol* 83 (1): 408-419
241. Wills E, Mou F and Baines JD (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 (10): 4800-4809
242. Wills E, Scholtes L and Baines JD (2006): **Herpes simplex virus 1 DNA packaging proteins encoded by UL6, UL15, UL17, UL28, and UL33 are located on the external surface of the viral capsid.** *J Virol* 80 (21): 10894-10899
243. Wilson C, Venditti R, Rega LR, Colanzi A, D'Angelo G and De Matteis MA (2010): **The Golgi apparatus: an organelle with multiple complex functions.** *Biochem J* 433 (1): 1-9
244. Wisner TW, Wright CC, Kato A, Kawaguchi Y, Mou F, Baines JD, Roller RJ and Johnson DC (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 (7): 3115-3126
245. Wolfstein A, Nagel CH, Radtke K, Dohner K, Allan VJ and Sodeik B (2006): **The inner tegument promotes herpes simplex virus capsid motility along microtubules in vitro.** *Traffic* 7 (2): 227-237
246. Wollert T and Hurley JH (2010): **Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes.** *Nature* 464 (7290): 864-869
247. Wollert T, Wunder C, Lippincott-Schwartz J and Hurley JH (2009): **Membrane scission by the ESCRT-III complex.** *Nature* 458 (7235): 172-177
248. Wu SX, Zhu XP and Letchworth GJ (1998): **Bovine herpesvirus 1 glycoprotein M forms a disulfide-linked heterodimer with the U(L)49.5 protein.** *J Virol* 72 (4): 3029-3036
249. Xiao J, Xia H, Zhou J, Azmi IF, Davies BA, Katzmann DJ and Xu Z (2008): **Structural basis of Vta1 function in the multivesicular body sorting pathway.** *Dev Cell* 14 (1): 37-49
250. Yeh PC, Meckes DG, Jr. and Wills JW (2008): **Analysis of the interaction between the UL11 and UL16 tegument proteins of herpes simplex virus.** *J Virol* 82 (21): 10693-10700
251. Yu H, Braun P, Yildirim MA, Lemmens I, Venkatesan K, Sahalie J, Hirozane-Kishikawa T, Gebreab F, Li N, Simonis N, Hao T, Rual JF, Dricot A, Vazquez A, Murray RR, Simon C, Tardivo L, Tam S, Svrzikapa N, Fan C, de Smet AS, Motyl A, Hudson ME, Park J, Xin X, Cusick ME, Moore T, Boone C, Snyder M, Roth FP, Barabasi AL, Tavernier J, Hill DE and Vidal M (2008): **High-quality binary protein interaction map of the yeast interactome network.** *Science* 322 (5898): 104-110
252. Zhang J, Nagel CH, Sodeik B and Lippe R (2009): **Early, active, and specific localization of herpes simplex virus type 1 gM to nuclear membranes.** *J Virol* 83 (24): 12984-12997
253. Zhang Y, Sirko DA and McKnight JL (1991): **Role of herpes simplex virus type 1 UL46 and UL47 in alpha TIF-mediated transcriptional induction: characterization of three viral deletion mutants.** *J Virol* 65 (2): 829-841
254. Zhou ZH, Dougherty M, Jakana J, He J, Rixon FJ and Chiu W (2000): **Seeing the herpesvirus capsid at 8.5 Å.** *Science* 288 (5467): 877-880

## 7 ANHANG

### 7.1 Das HSV-1 Proteom

Diese tabellarische Übersicht ist im Wesentlichen auf Grundlage von Roizman *et al.*, 2007 sowie der Gendatenbank von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) zusammengetragen. Die ORFs von konservierten Proteinen sind unterstrichen. Die Markierung mit einem Sternchen (\*) bezeichnet kodierende Sequenzen der Membranproteine. Die HSV-1 Proteine werden in drei Typen unterteilt: Membran, Tegument und Capsid. Das Vorkommen in reifen Viruspartikeln (Loret *et al.*, 2008) wird durch (+) gekennzeichnet. Nicht-Strukturproteine besitzen in der Regel enzymatische oder genregulatorische Funktionen.

**Tabelle 7.1: Das HSV-1 Proteom**

ORF	Name	Phase	Typ	Lokalisierung	Funktion und Eigenschaften
RL1	ICP34.5, <u><math>\gamma</math>34.5</u>	$\gamma$ 1	Tegument (+)	Nukleus	Neurovirulenzfaktor; inhibiert Stress-induzierten Translationsarrest
RL2	ICP0, $\alpha$ 0	$\alpha$	Tegument (+)	Nukleus und Cytoplasma	Transaktivator der Transkription; Ubiquitin E3 Ligase
<u>UL1*</u>	gL	$\gamma$ 2	Membran (+)	Golgi- und Plasmamembran	komplexiert mit gH (UL22); vermittelt Zellfusion, beteiligt am <i>entry</i>
<u>UL2</u>		$\beta$ / $\gamma$ 1	-	Nukleus	Uracil-N-Glykosylase; DNA-Reparatur
UL3		$\gamma$ 2	-	Nukleus	kolokalisiert mit ICP22 (pUS1) und pUL4 in nukleären Substrukturen
UL4		$\gamma$ 2	Tegument	Nukleus	kolokalisiert mit ICP22 (pUS1) und pUL3 in nukleären Substrukturen
<u>UL5</u>		$\beta$	-	Nukleus	bildet mit pUL52 und pUL8 den viralen Helikase-Primase Komplex
<u>UL6</u>		$\gamma$	Capsid (+)	Nukleus	Portalprotein; DNA- <i>packaging</i>
<u>UL7</u>		$\gamma$ 1	Tegument (+)	Nukleus und Cytoplasma	Funktion unbekannt
<u>UL8</u>		$\beta$	-	Nukleus	bildet mit pUL52 und pUL5 den viralen Helikase-Primase Komplex
<u>UL9</u>		$\beta$	-	Nukleus	<i>ori</i> -bindendes Protein; DNA-Helikase Aktivität
<u>UL10*</u>	gM	$\gamma$ 2	Membran (+)	Golgi- und Plasmamembran	wahrscheinlich beteiligt an sekundärer Umhüllung; komplexiert mit gN (UL49A)
<u>UL11</u>		$\gamma$	Tegument (+)	Kern- und Plasmamembran	myristyliertes Protein; assoziiert mit zellulären Membranen; Funktion unbekannt, evtl. Viriontransport ( <i>egress</i> )
<u>UL12</u>		$\beta$	-	Nukleus	alkalische Nuklease
<u>UL13</u>		$\gamma$	Tegument (+)	-	Serin/Threonin-Proteinkinase

ORF	Name	Phase	Typ	Lokalisierung	Funktion und Eigenschaften
<u>UL14</u>		$\gamma$ 2	Tegument (+)	-	Kerntransport von pUL48 (VP16) und Capsiden
<u>UL15</u>		$\gamma$	Capsid	Nukleus	bildet mit pUL28 die virale Terminase, Spaltung der konkatameren DNA und DNA-packaging
<u>UL16</u>		$\gamma$	Tegument (+)	Nukleus und Cytoplasma	Capsid-assoziiert
<u>UL17</u>		$\gamma$	Capsid (+)	-	DNA-packaging und Capsidreifung
<u>UL18</u>	VP23	$\gamma$ 1	Capsid (+)	-	Capsid-Triplexprotein (zusammen mit pUL38 (VP19C))
<u>UL19</u>	VP5, ICP5	$\gamma$	Capsid (+)	-	Hauptcapsidprotein
UL20*		$\gamma$ 1	Membran (+)	Golgi-, Kern- und Plasmamembran	interagiert mit gK (UL53), beteiligt an Zell-Zell-Fusion und sekundärer Umhüllung
<u>UL21</u>		$\gamma$	Tegument (+)	Cytoplasma	interagiert mit Mikrotubuli
<u>UL22*</u>	gH	$\gamma$	Membran (+)	Golgi- und Plasmamembran	komplexiert mit gL (UL1), Virus entry
UL23	ICP36	$\beta$	Tegument (+)	Nukleus	Thymidinkinase
<u>UL24</u>		$\gamma$ 1	-	membran-assoziiert, Nukleus	Funktion unbekannt
<u>UL25</u>		$\gamma$ 2	Capsid (+)	-	DNA-packaging und Capsidreifung
<u>UL26</u>	VP24 (+) und VP21	$\gamma$	Capsid	-	Serin-Protease (VP24, N-terminaler Bereich); Autoproteolyse des pUL26-Vorläufers; beides Scaffolding-Proteine (VP21, C-terminaler Bereich)
<u>UL26.5</u>	VP22a	$\gamma$	Capsid	-	Scaffolding-Protein, Substrat von pUL26
<u>UL27*</u>	gB	$\gamma$ 1	Membran (+)	Golgi- und Plasmamembran	Virus entry, Zell-Zellfusion
<u>UL28</u>	ICP18.5	$\gamma$	Capsid	Nukleus	bildet mit pUL15 die virale Terminase, Spaltung der konkatameren DNA und DNA-packaging
<u>UL29</u>	ICP8	$\beta$	-	Nukleus	single-stranded binding protein, virale DNA-Replikation
<u>UL30</u>		$\beta$	-	Nukleus	katalytische Untereinheit der DNA-Polymerase; Heterodimer mit pUL42
<u>UL31</u>		$\gamma$ 1	Tegument	Nukleus	Capsid-Auswanderung aus dem Nukleus (zusammen mit pUL34)
<u>UL32</u>		$\gamma$ 2	-	Cytoplasma und Nukleus	DNA packaging
<u>UL33</u>		$\gamma$ 2	Capsid	Nukleus	DNA packaging, interagiert mit viraler Terminase (pUL15 und pUL28)
<u>UL34*</u>		$\gamma$ 1	Membran	Kernmembran	Capsid-Auswanderung aus dem Nukleus (zusammen mit pUL31), Substrat von pUS3
<u>UL35</u>	VP26	$\gamma$ 2	Capsid (+)	-	small capsid protein

ORF	Name	Phase	Typ	Lokalisierung	Funktion und Eigenschaften
<u>UL36</u>	ICP1/2	$\gamma$ 2	Tegument (+)	Cytoplasma , Golgi	großes Tegumentprotein, interagiert mit pUL37
<u>UL37</u>	ICP7	$\gamma$ 1	Tegument (+)	Cytoplasma , Golgi	interagiert mit pUL36, Beteiligung an sekundärer Umhüllung
<u>UL38</u>	VP19C	$\gamma$ 2	Capsid (+)	-	Capsid-Triplexprotein (zusammen mit pUL18 (VP23))
<u>UL39</u>	ICP6/10	$\beta$	-	Nukleus	Ribonukleotid-Reduktase (große Untereinheit), Proteinkinase
UL40		$\beta$	-	Nukleus	Ribonukleotid-Reduktase (kleine Untereinheit)
UL41	Vhs	$\gamma$ 1	Tegument (+)	-	<i>virion host shut-off</i> (Vhs), degradiert mRNA früh in der Infektion, wird später durch Assoziation mit pUL48 (VP16) inhibiert
<u>UL42</u>		$\beta$	-	Nukleus	Prozessivitätsfaktor der DNA-Polymerase, komplexiert mit pUL30
UL43*		$\gamma$	Membran	-	unbekannte Funktion
UL44*	gC	$\gamma$ 2	Membran (+)	Golgi- und Plasmamembran	Virus <i>entry</i> , Bindung an Proteoglykane der Zelloberfläche (Heparan- oder Chondroitinsulfat); moduliert Komplementaktivierung
UL45*		$\gamma$ 2	Membran (+)	ER-assoziiert	Virus <i>entry</i> , pH-abhängige Endozytose
UL46	VP11/12	$\gamma$ 1	Tegument (+)	Nukleus	moduliert VP16 (pUL48)
UL47	VP13/14	$\gamma$ 1	Tegument (+)	Nukleus	moduliert VP16 (pUL48), RNA-bindendes Protein, interagiert mit Capsidprotein pUL17
UL48	VP16	$\gamma$	Tegument (+)	Nukleus	$\alpha$ -trans-induzierender Faktor ( $\alpha$ -TIF), induziert Transkription der $\alpha$ -Gene
UL49	VP22	$\gamma$ (?)	Tegument (+)	Cytoplasma und Nukleus	bindet an Mikrotubuli, rekrutiert ICPO während Virus <i>assembly</i>
<u>UL49A*</u>	gN	$\gamma$ 2	Membran	Golgi- und Plasmamembran	komplexiert mit gM (UL10)
<u>UL50</u>		$\beta$	Tegument (+)	Nukleus	dUTPase
<u>UL51</u>		$\gamma$ 1	Tegument (+)	Golgi	Virion-Reifung nach primärer Umhüllung
<u>UL52</u>		$\beta$	-	Nukleus	bildet mit pUL52 und pUL8 den viralen Helikase-Primase Komplex
UL53*	gK	$\gamma$	Membran	Golgi-, Kern- und ER-Membran	interagiert mit pUL20, moduliert Zell-Zellfusion
<u>UL54</u>	ICP27	$\alpha$	-	Cytoplasma und Nukleus	multifunktionales RNA-bindendes Protein; inhibiert prä-mRNA-Splicing, exportiert virale mRNA aus dem Kern
UL55		$\gamma$ 2	Tegument (+)	Nukleus	Funktion unbekannt, evtl. <i>Virion assembly</i>
UL56*		$\gamma$ 2	Membran (+)	Golgi- und Plasmamembran	Funktion unbekannt

ORF	Name	Phase	Typ	Lokalisierung	Funktion und Eigenschaften
RS1	ICP4	$\alpha$	Tegument	Nukleus	$\alpha$ -regulatorisches Protein
US1	ICP22	$\alpha$	-	Nukleus	$\alpha$ -regulatorisches Protein
US2		$\gamma$ 2	Tegument (+)	-	Funktion unbekannt
US3		$\gamma$ 1	Tegument (+)	-	Serin/Threonin-Proteinkinase, beteiligt an Capsidauswanderung aus dem Kern
US4*	gG	$\gamma$ 1	Membran (+)	Golgi- und Plasmamembran	Funktion unbekannt
US5*	gJ	$\gamma$	Membran	Golgi- und Plasmamembran	Blockierung der Apoptose
US6*	gD	$\gamma$	Membran (+)	Golgi- und Plasmamembran	Virus <i>entry</i> , Bindung an zelluläre Rezeptoren
US7*	gI	$\gamma$ 1	Membran (+)	Golgi- und Plasmamembran	komplexiert mit gE (US8) zu Fc-Rezeptor; Zell-Zell-Ausbreitung
US8*	gE	$\gamma$ 1	Membran (+)	Golgi- und Plasmamembran	komplexiert mit gI (US7) zu Fc-Rezeptor; Zell-Zell-Ausbreitung
US8A*		$\gamma$ 1	Membran	Nukleoli	Funktion unbekannt
US9*		$\gamma$	Membran (+)	-	anterograde Transport der Virionen im Axon
US10		$\gamma$ 1	Tegument (+)	Nukleus	Funktion unbekannt
US11		$\gamma$ 2	Tegument	Nukleoli	dsRNA-Bindeprotein, blockiert Proteinkinase R
US12	ICP47	$\alpha$	-	Cytoplasma und Nukleus	blockiert Antigenpräsentation auf Zelloberfläche

## 7.2 Y2H-Daten für intravirale Netzwerke

### 7.2.1 Das intravirale Netzwerk der HSV-1 Membranproteine

Diese Tabelle diente als Grundlage zur Erstellung des Netzwerkes in Abbildung 4.2 mit Hilfe der *Cytoscape-Software*. Der Zahlenwert der Stärke bestimmt das Aussehen der Verbindungslinien. Ein Wert von 1 bedeutet eine unidirektionale Protein-Protein-Interaktion (PPI) und ist als gestrichelte Linie dargestellt. Ein höherer Wert von 2 oder 3 repräsentiert eine bidirektionale PPI und/oder solche mit mehreren Fragmenten desselben Proteins (einfache bzw. fette Linie).

**Tabelle 7.2: Das intravirale Netzwerk der HSV-1 Membranproteine**

Protein 1	Protein 2	Stärke
UL1/gL	UL1/gL	2
UL1/gL	UL53/gK	2
UL1/gL	US6/gD	2
UL1/gL	US8/gE	3
UL1/gL	UL22/gH	1
UL1/gL	pUL56	1

Protein 1	Protein 2	Stärke
UL10/gM	pUS2	1
UL10/gM	pUL28	1
UL10/gM	pUL49	1
UL10/gM	pUL52	1
UL10/gM	pUL56	3
UL10/gM	pUL34	1

Protein 1	Protein 2	Stärke
UL1/gL	pUS8A	1
UL22/gH	US4/gG	1
UL27/gB	US4/gG	1
UL44/gC	US6/gD	1
UL44/gC	UL53/gK	1
UL53/gK	US8/gE	1
UL53/gK	UL53/gK	1
UL53/gK	pUL56	1
US8/gE	UL22/gH	1
US8/gE	UL27/gB	1
US8/gE	US7/gI	1
US8/gE	US8/gE	1
pUL45	UL1/gL	1
pUL45	UL53/gK	2
pUL45	US6/gD	1
pUL45	pUL56	1
pUL45	US5/gJ	1
pUL45	US8/gE	1
pUL45	pUL45	1
UL10/gM	pUL33	1
UL10/gM	UL10/gM	1
UL10/gM	pUL31	2
UL10/gM	pUL40	2

Protein 1	Protein 2	Stärke
UL10/gM	pUL38	1
UL10/gM	pUL7	1
UL10/gM	pUL14	1
UL10/gM	pUS10	1
UL10/gM	pUL54	1
pUL20	pUL40	1
pUL20	pUL54	1
pUL34	pUL31	2
pUL34	pUL33	1
pUL34	pUL40	2
pUL34	pUS2	1
pUL34	pUL26	1
pUL34	pUL26.5	1
pUL34	pUL28	1
pUL34	pUL37	1
pUL34	pUL51	1
US7/gI	pUL33	1
US7/gI	pUL40	1
US7/gI	pUL7	1
US7/gI	pUL16	1
pUS9	pUS2	1
pUS9	pUL49	1

### 7.2.2 Das erweiterte HSV-1 Interaktom/im Kontext des reifen Viruspartikels

Diese Tabelle diente als Grundlage zur Erstellung der Netzwerke in Abbildung 4.6. bzw. Abbildung 4.7 (**fett markiert**, im Kontext des reifen Viruspartikels nach Loret *et al.*, 2008) mit Hilfe der *Cytoscape-Software*. Der Zahlenwert der Stärke bestimmt das Aussehen der Verbindungslinien. Ein Wert von 1 bedeutet eine unidirektionale Protein-Protein-Interaktion (PPI) und ist als gestrichelte Linie dargestellt. Ein höherer Wert von 2 oder 3 repräsentiert eine bidirektionale PPI und/oder solche mit mehreren Fragmenten desselben Proteins (einfache bzw. fette Linie).

**Tabelle 7.3: Das erweiterte HSV-1 Interaktom/im Kontext des reifen Viruspartikels**

Protein 1	Protein 2	Stärke
<b>pRL2</b>	<b>pUL49</b>	2
UL10/gM	UL49A/gN	1
UL10/gM	pUS8A	1
<b>pUL11</b>	<b>pUL16</b>	2
<b>pUL14</b>	<b>pUL14</b>	1

Protein 1	Protein 2	Stärke
pUL7	pUL33	1
<b>pUL7</b>	<b>pUL7</b>	1
<b>pUL7</b>	<b>pUS2</b>	1
pUL9	pUL15	1
pUL9	pUL33	1

Protein 1	Protein 2	Stärke
<b>pUL16</b>	<b>pUL14</b>	1
<b>pUL16</b>	<b>pUL21</b>	2
pUL16	pUL33	1
pUL17	pUL33	1
pUL2	pUL12	1
pUL2	pUL14	1
pUL2	pUL33	1
pUL2	pUL37	1
pUL2	pUL40	1
<b>pUL21</b>	<b>pUL20</b>	1
pUL23	pUL40	1
pUL28	pUL33	1
pUL28	pUL40	1
pUL28	pUS2	1
pUL3	pUL4	2
pUL30	pUL14	1
pUL30	pUL33	1
pUL30	pUL40	1
pUL31	pUL34	2
pUL33	pUL33	1
pUL34	pUL14	1
<b>pUL36</b>	<b>pUL48</b>	1
<b>pUL38</b>	<b>pUL14</b>	1
<b>pUL38</b>	<b>pUL18</b>	1
pUL38	pUL33	1
<b>pUL38</b>	<b>pUL48</b>	1
pUL40	pUL40	1
pUL40	pUL14	1
pUL40	pUL15	1
pUL40	pUL33	1
pUL40	pUL37	1
<b>UL44/gC</b>	<b>pUL17</b>	1
<b>UL44/gC</b>	<b>pUL21</b>	1
UL44/gC	pUL33	1
UL44/gC	pUL40	1
<b>pUL45</b>	<b>pUL45</b>	1
pUL45	UL53/gK	2
pUL46	pUL33	1
<b>pUL47</b>	<b>pUL14</b>	1
pUL47	pUL15	1

Protein 1	Protein 2	Stärke
pUS1	US7/gI	1
<b>pUS10</b>	<b>pUL14</b>	1
<b>pUS10</b>	<b>pUL23</b>	1
pUS10	pUL33	1
pUS11	pUS11	1
pUS2	pUL33	1
<b>pUS2</b>	<b>pUS2</b>	1
US4/gG	UL53/gK	1
US8/gE	UL53/gK	1
<b>UL1/gL</b>	<b>UL1/gL</b>	2
UL1/gL	UL53/gK	2
<b>UL1/gL</b>	<b>US6/gD</b>	2
<b>UL1/gL</b>	<b>US8/gE</b>	3
<b>UL1/gL</b>	<b>UL22/gH</b>	1
<b>UL1/gL</b>	<b>pUL56</b>	1
UL1/gL	pUS8A	1
<b>UL22/gH</b>	<b>US4/gG</b>	1
<b>UL27/gB</b>	<b>US4/gG</b>	1
<b>UL44/gC</b>	<b>US6/gD</b>	1
UL44/gC	UL53/gK	1
UL53/gK	pUL56	1
<b>US8/gE</b>	<b>UL22/gH</b>	1
<b>US8/gE</b>	<b>UL27/gB</b>	1
<b>US8/gE</b>	<b>US7/gI</b>	1
<b>US8/gE</b>	<b>US8/gE</b>	1
<b>pUL45</b>	<b>UL1/gL</b>	1
<b>pUL45</b>	<b>US6/gD</b>	1
<b>pUL45</b>	<b>pUL56</b>	1
pUL45	US5/gJ	1
pUL45	US8/gE	1
UL10/gM	pUL33	1
<b>UL10/gM</b>	<b>UL10/gM</b>	1
UL10/gM	pUL31	2
UL10/gM	pUL40	2
<b>UL10/gM</b>	<b>pUS2</b>	1
UL10/gM	pUL28	1
<b>UL10/gM</b>	<b>pUL49</b>	1
UL10/gM	pUL52	1
<b>UL10/gM</b>	<b>pUL56</b>	3
UL10/gM	pUL34	1

Protein 1	Protein 2	Stärke
<b>pUL47</b>	<b>pUL17</b>	1
<b>pUL47</b>	<b>pUL21</b>	1
pUL47	pUL40	1
pUL47	pUL48	1
pUL47	pUL49	1
pUL47	pUS1	1
pUL47	pUS11	1
<b>pUL49</b>	<b>pUL49</b>	1
<b>pUL49</b>	<b>US8/gE</b>	2
UL49A/gN	UL49A/gN	1
UL49A/gN	pUL15	1
UL49A/gN	pUL33	1
UL53/gK	UL53/gK	1
pUL54	pUL54	1
pUL55	pUL33	1
<b>pUL56</b>	<b>pUL21</b>	1
<b>pUL56</b>	<b>pUL49</b>	1
pUL56	pUS1	1
pUL56	pUS11	1
<b>pUL7</b>	<b>pUL14</b>	1
pUL7	pUL15	1
<b>pUL7</b>	<b>pUL16</b>	1

Protein 1	Protein 2	Stärke
<b>UL10/gM</b>	<b>pUL38</b>	1
<b>UL10/gM</b>	<b>pUL7</b>	1
<b>UL10/gM</b>	<b>pUL14</b>	1
<b>UL10/gM</b>	<b>pUS10</b>	1
UL10/gM	pUL54	1
pUL20	pUL40	1
pUL20	pUL54	1
pUL34	pUL33	1
pUL34	pUL40	2
pUL34	pUS2	1
pUL34	pUL26	1
pUL34	pUL26.5	1
pUL34	pUL28	1
pUL34	pUL37	1
pUL34	pUL51	1
US7/gl	pUL33	1
US7/gl	pUL40	1
<b>US7/gl</b>	<b>pUL7</b>	1
<b>US7/gl</b>	<b>pUL16</b>	1
<b>pUS9</b>	<b>pUS2</b>	1
<b>pUS9</b>	<b>pUL49</b>	1

### 7.3 Y2H-Daten der Virus-Wirt-Interaktionen

#### 7.3.1 Interaktionen von ESCRT- und HSV-1 Proteinen/im Kontext des reifen Viruspartikels

Diese Tabelle diene als Grundlage zur Erstellung des Netzwerkes in Abbildung 4.17 bzw. Abbildung 4.18 (**fett markiert**, im Kontext des reifen Viruspartikels nach Loret *et al.*, 2008) mit Hilfe der *Cytoscape-Software*. Der Zahlenwert der Stärke bestimmt das Aussehen der Verbindungslinien. Ein Wert von 1 bedeutet eine unidirektionale Protein-Protein-Interaktion (PPI) und ist als gestrichelte Linie dargestellt. Ein höherer Wert von 2 oder 3 repräsentiert eine bidirektionale PPI und/oder solche mit mehreren Fragmenten desselben Proteins (einfache bzw. fette Linie).

Tabelle 7.4: Interaktionen von ESCRT- und HSV-1 Proteinen/im Kontext des reifen Viruspartikels

ESCRT	HSV-1	Stärke
<b>STAM1</b>	<b>pUL7</b>	1
<b>STAM1</b>	<b>pUL14</b>	1
<b>STAM1</b>	<b>pUL16</b>	1
STAM1	pUL34	1

ESCRT	HSV-1	Stärke
<b>VPS25</b>	<b>pUL14</b>	1
VPS25	pUL34	1
<b>SNF7B</b>	<b>pUL16</b>	1
<b>SNF7B</b>	<b>UL44/gC</b>	1

ESCRT	HSV-1	Stärke
<b>STAM1</b>	<b>pUL38</b>	1
<b>STAM1</b>	<b>pUL47</b>	1
<b>STAM1</b>	<b>pUL56</b>	1
<b>TSG101</b>	<b>pUL7</b>	2
<b>TSG101</b>	<b>UL10/gM</b>	1
<b>TSG101</b>	<b>pUL14</b>	2
TSG101	pUL33	1
<b>TSG101</b>	<b>pUL35</b>	1
TSG101	pUL40	2
<b>TSG101</b>	<b>pUL51</b>	1
TSG101	pUL34	1
<b>TSG101</b>	<b>pUL36</b>	1
<b>TSG101</b>	<b>pUL47</b>	1
VPS28	pUL3	1
<b>VPS28</b>	<b>pUL7</b>	1
<b>VPS28</b>	<b>pUL14</b>	1
VPS28	pUL33	1
<b>VPS28</b>	<b>pUL35</b>	1
VPS37B	pUL3	1
<b>VPS37B</b>	<b>pUL7</b>	2
<b>VPS37B</b>	<b>pUL14</b>	1
VPS37B	pUL15	1
<b>VPS37B</b>	<b>pUL26</b>	1
VPS37B	pUL31	1
VPS37B	pUL33	1
<b>VPS37B</b>	<b>pUL35</b>	2
VPS37B	pUL40	1
VPS37B	pUL34	1
<b>VPS22</b>	<b>pUL7</b>	1
<b>VPS22</b>	<b>UL10/gM</b>	1
<b>VPS22</b>	<b>pUL14</b>	1
<b>VPS22</b>	<b>pUL16</b>	1
<b>VPS22</b>	<b>pUL26</b>	1
VPS22	pUL31	1
VPS22	pUL33	1
VPS22	pUL34	1
<b>VPS22</b>	<b>pUL35</b>	2
<b>VPS22</b>	<b>pUL36</b>	1
<b>VPS22</b>	<b>pUL38</b>	1
<b>VPS22</b>	<b>UL44/gC</b>	1

ESCRT	HSV-1	Stärke
<b>SNF7B</b>	<b>pUL47</b>	1
SNF7B	pUL54	1
<b>SNF7B</b>	<b>pUL56</b>	1
<b>CHMP5</b>	<b>UL10/gM</b>	1
CHMP5	pUL33	1
<b>CHMP5</b>	<b>pUL49</b>	1
<b>CHMP5</b>	<b>US7/gI</b>	1
<b>VPS4A</b>	<b>pUS2</b>	1
<b>VPS4B</b>	<b>pUL7</b>	1
VTA1	pUL4	1
VTA1	pUL5	1
<b>VTA1</b>	<b>pUL7</b>	1
<b>VTA1</b>	<b>UL10/gM</b>	1
<b>VTA1</b>	<b>pUL14</b>	1
VTA1	pUL15	1
<b>VTA1</b>	<b>pUL21</b>	1
<b>VTA1</b>	<b>pUL23</b>	1
<b>VTA1</b>	<b>pUL26</b>	2
VTA1	pUL26.5	1
VTA1	pUL31	1
VTA1	pUL33	1
<b>VTA1</b>	<b>pUL35</b>	1
<b>VTA1</b>	<b>pUL37</b>	1
<b>VTA1</b>	<b>pUL38</b>	1
VTA1	pUL40	2
VTA1	pUL43	2
<b>VTA1</b>	<b>pUL48</b>	1
<b>VTA1</b>	<b>pUL49</b>	1
VTA1	UL49A/gN	1
<b>VTA1</b>	<b>pUS2</b>	1
<b>VTA1</b>	<b>US8/gE</b>	1
VTA1	pUS8A	1
VTA1	pUL21	1
VTA1	pUL54	1
<b>ALIX</b>	<b>pUL47</b>	1
<b>ALIX</b>	<b>pUL56</b>	1
AMSH	pUL34	1
<b>AMSH</b>	<b>pUL38</b>	1
<b>AMSH</b>	<b>UL44/gC</b>	1
<b>AMSH</b>	<b>pUL47</b>	1

ESCRT	HSV-1	Stärke
VPS22	pUL47	1
VPS22	pUL56	2
VPS22	pUS10	1
VPS22	pRL1	1
VPS25	pUL7	1

ESCRT	HSV-1	Stärke
AMSH-LP	pUL34	1
AMSH-LP	UL44/gC	1
AMSH-LP	pUL47	1
AMSH-LP	pUL56	1

## 7.4 Abkürzungen

	% (v/v)	Volumenprozent ( <i>volume per volume</i> )
	% (w/v)	Gewichtsprozent ( <i>weight per volume</i> )
	°C	Grad Celsius
	μ	Mikro
	3-AT	3-Amino-1,2,4-triazol
	4-MUx	4-Methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-galactopyranosid
	Å	Ångström
	$\gamma$	Potenzkoeffizient
	$\phi$	sperrige hydrophobe Aminosäure
<b>A...</b>	A	Ampere
	AAA+	<i>ATPases associated with diverse cellular activities</i>
	ac	<i>acidic cluster</i>
	AD	Aktivierungsdomäne
	Ade/A	Adenin
	AMSH	<i>associated molecule with the SH3 domain of STAM</i>
	APS	Ammoniumperoxodisulfat
	As.	Aminosäure
<b>B...</b>	BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
	bp	Basenpaar
	BRET	<i>bioluminescence resonance energy transfer</i>
<b>C...</b>	c	Zenti
	<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
	Cam <sup>R</sup>	Chloramphenicol-Resistenz
	CD5L	<i>CD5 leader sequence</i>
	cf	Korrekturfaktor
	CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
	COP	<i>coatamer protein</i>
<b>D...</b>	<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
	DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
	DBD	DNA-bindende Domäne
	D-MEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
	DMSO	Dimethylsulfoxid
	DNA	Desoxyribonukleinsäure

	dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
	DOG	2-Deoxy-Galaktose
	dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
	DTT	1,4-Dithiothreitol
	DUB	Deubiquitinierendes Enzym
<b>E...</b>	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
	EBV	Epstein-Barr-Virus
	ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
	EndoH	Endoglykosidase H
	ER	endoplasmatisches Retikulum
	ESCRT	<i>endosomal sorting complex required for transport</i>
	EtOH	Ethanol
<b>F...</b>	FAM	5-Carboxyfluorescein
	Fc	kristallisierbares Fragment (Antikörper)
	FCS	Fötale Kälberserum
	Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	Eisen(II)-sulfat
	FL	<i>full length</i>
<b>G...</b>	g	Erdbeschleunigung
	g	Gramm
	GaHV-2	Gallides Herpesvirus 2
	Gal	Galaktokinase
	<i>gk</i>	<i>galk</i> -kan Kasette
	gX	Glykoprotein X
<b>H...</b>	h	Stunde
	h.p.i.	<i>hours post infection</i>
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	bidestilliertes Wasser
	hCMV	humanes Cytomegalovirus
	HHV	humanpathogenes Herpesvirus
	His/H	Histidin
	HIV-1	Humanes Immundefizienzvirus-1
	HSV-1	Herpes simplex-Virus 1
	HSV-2	Herpes simplex-Virus 2
	HVEM	<i>herpesvirus entry mediator</i>
<b>I...</b>	I	Lichtemission
	ICP	<i>infected cell protein</i>
	IF	indirekte Immunofluoreszenz
	IgG	Immunglobulin G
	ILV	intraluminale Vesikel
	INM	innere Kernmembran
	IR	<i>internal repeat</i>
<b>K...</b>	k	Verknüpfungsgrad

	KAc	Kaliumacetat
	Kan <sup>R</sup>	Kanamycin-Resistenz
	kb	Kilobasenpaare
	KCl	Kaliumchlorid
	kDa	Kilo-Dalton
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
	KOH	Kaliumhydroxid
	KSHV	Kaposi-Sarkom-assoziiertes Herpesvirus
<b>L...</b>	l	Liter
	LB	<i>lysogeny broth</i>
	Leu/L	Leucin
<b>M...</b>	m	Milli
	m	Meter
	M	Molar
	<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
	MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
	MGC	<i>mammalian gene collection</i>
	MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
	MIM	<i>MIT-interacting motif</i>
	min	Minute
	MIT	<i>microtubule interacting and transport</i>
	MnCl <sub>2</sub>	Manganchlorid
	MOI	<i>multiplicity of infection</i>
	MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
	MuHV-4	Murides Herpesvirus 4
	MVB	<i>multivesicular body</i>
<b>N...</b>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ammoniumsulfat
	n	Nano
	NaCl	Natriumchlorid
	NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
	NEAA	Nichtessenzielle Aminosäuren
	NEC	<i>nuclear egress complex</i>
	NLS	Kernlokalisierungssignal
<b>O...</b>	OD	optische Dichte
	ONM	äußere Kernmembran
	ORF	<i>open reading frame</i>
	<i>ori</i>	<i>origin of replication</i>
<b>P...</b>	PBS	<i>Dulbecco's Phosphate-buffered Saline</i>
	PCR	Polymerasekettenreaktion
	PEG	Polyethylenglykol
	Pen	Penicillin
	pfu	<i>plaque forming units</i>

	PI3P	Phosphatidylinositol-3-Phosphat
	Pox	<i>horseradish peroxidase</i>
	PPI	Protein-Protein-Interaktion
	PRV	Pseudorabiesvirus
<b>R...</b>	R	BRET-Ratio
	RFU	<i>relative fluorescence units</i>
	Rluc	Renilla Luciferase
	RNA	Ribonukleinsäure
	RNAi	RNA-Interferenz
	RT	Raumtemperatur
<b>S...</b>	s	Sekunde
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	SDS	Dodecylsulfat Natriumsalz
	SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
	SRP	<i>signal recognition particle</i>
	Strep	Streptomycin
<b>T...</b>	TAMRA	5-carboxytetramethylrhodamine
	TEMED	N,N,N,,N,,-Tetramethylendiamin
	TGN	<i>trans</i> -Golgi Netzwerk
	TM	Transmembran
	TR	<i>terminal repeat</i>
	Trp/W	Tryptophan
<b>U...</b>	U	<i>unit</i>
	Ub	Ubiquitin
	UBPY	Ubiquitin Isopeptidase Y
	UL	<i>unique long</i>
	Upm	Umdrehungen pro Minute
	US	<i>unique short</i>
	UV	ultraviolett
<b>V...</b>	V	Volt
	Vhs	<i>virion host shut-off</i>
	VL	Volle-Länge
	VP	Virion-Protein
	VPS	<i>vacuolar protein sorting</i>
	VZV	Varicella-Zoster-Virus
<b>W...</b>	WB	Western Blot
	wt	Wildtyp
<b>Y...</b>	Y	Tyrosin
	Y2H	Hefe-2-Hybridsystem
	YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>

## 7.5 Publikationen und Kongressbeiträge

Die vorliegende Arbeit wurde am Max von Pettenkofer-Institut der Ludwigs-Maximilians-Universität München in der Zeit von Dezember 2007 bis September 2011 angefertigt. Teile dieser Studie werden unter folgendem Titel veröffentlicht:

**Striebinger H**, Zhang J, Ott M, Duron J, Ruzsics Z, Haas J, Lippe R, Bailer SM (submitted Sept. 2011). Subcellular trafficking and functional importance of Herpes simplex virus-1 Glycoprotein M domains. *Journal of General Virology*

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

Schmidt T, **Striebinger H**, Haas J, Bailer SM (2010). The heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is important for Herpes simplex virus-1 propagation. *FEBS Letters*, 584(20)

Bosse JB, Bauerfeind R, Wodrich H, Popilka L, Marcinowski L, **Striebinger H**, Jung C, von Einem J, Walther P, Koszinowski UH, Ruzsics Z (In Preparation). Quantification of Cytomegalovirus Capsid Dynamics in Living Cells.

Teile dieser Arbeit wurden auf folgenden Kongressen präsentiert:

21<sup>st</sup> Meeting of the Society for Virology 2011, Freiburg (Oral Presentation)

**Striebinger H**, Zhang J, Ott M, Duron J, Ruzsics Z, Haas J, Lippe R, Bailer SM. Functional Analysis of the Cytoplasmic Tail of Herpes simplex virus-1 Glycoprotein M.

4<sup>th</sup> European Congress of Virology 2010, Como, Italy (Oral Presentation)

**Striebinger H**, Schmidt T, Haas J, Bailer SM. The heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is required for efficient Herpes simplex virus-1 replication.

## 7.6 Danksagung

Abschließend möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonderer Dank geht dabei an Frau PD Dr. Susanne M. Bailer für die Bereitstellung des attraktiven Themas, die ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung während der Durchführung dieser Arbeit, ihre stetige Diskussionsbereitschaft sowie die kritische Durchsicht dieses Manuskripts.

Weiterer Dank gebührt allen Mitgliedern der Promotionskommission für ihre Bereitschaft, diese Aufgabe zu übernehmen.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. Jürgen Haas für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Labor im Max von Pettenkofer-Institut durchzuführen.

Ein großes Dankeschön geht an alle, die mich bei der technischen Durchführung verschiedener Experimente unterstützt haben: Melanie Ott und Verena Raschbichler bei der BAC-Mutagenese, Marcus Heinzmann bei der Klonierung der ESCRTs, Dr. Amelie Lotz-Havla und Anja Schultze (AG Muntau, LMU München) beim BRET-Assay und der Arbeitsgruppe von Dr. Roger Lippé (Université de Montréal) für die EM-Aufnahmen.

Ich danke allen aktuellen und ehemaligen Kollegen aus dem Labor, besonders aber den „Mädels“ Julia, Melanie und Verena sowohl für die Zeit im als auch außerhalb des Instituts. Ebenso danke ich Rudi und Marcus sowie allen anderen Mitgliedern der „AG Spaß“ für die erfrischende Abwechslung.

Ganz besonders danke ich meiner Familie und Freunden für die wirklich wichtigen Dinge im Leben.